

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Programa de Pós-graduação

**VALIDAÇÃO DA IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR
PARA O DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA
EQUINA EM EQUÍDEOS E COMPARAÇÃO COM O
ELISA RGP90 E IMUNOBLOT**

Fernanda Gonçalves de Oliveira

Belo Horizonte – MG/Brasil
Julho/2011

Fernanda Gonçalves de Oliveira

**VALIDAÇÃO DA IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR
PARA O DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA
EQUINA EM EQUÍDEOS E COMPARAÇÃO COM O
ELISA RGP90 E IMUNOBLOT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte – MG/Brasil
Julho/2011

O48v Oliveira, Fernanda Gonçalves de, 1984-
Validação da imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico da anemia infecciosa equina em equídeos e comparação com o ELISA rgp90 e Imunoblot / Fernanda Gonçalves de Oliveira. – 2011.
55 p. : il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

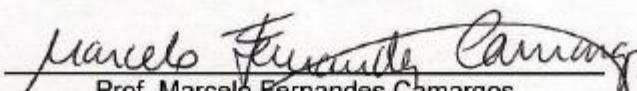
1. Equino – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa eqüina – Diagnóstico – Teses.
3. Teste imunoenzimático – Teses. 4. Imunodifusão – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 96

Dissertação defendida e aprovada 18 de julho de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



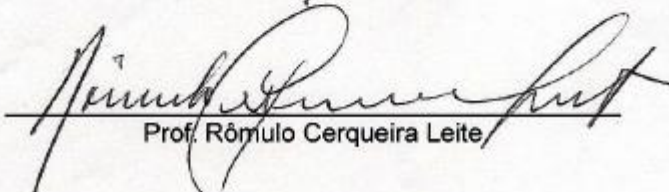
Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente



Prof. Marcelo Fernandes Camargos



Prof. Amauri Alcindo Alfieri



Prof. Rômulo Cerqueira Leite

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista ao meu pai, Fernando Alves de Oliveira, onde quer que você esteja.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me abençoar em todos os momentos de minha vida.

Ao meu pai pelos exemplos de vida, luta e perseverança.

À minha mãe, Sueli, e ao meu irmão, Henrique, pelo apoio incondicional, amor e paciência durante a realização dessa primeira etapa de um sonho.

À minha sobrinha Millena pelas alegrias e sorrisos, sempre.

Ao meu namorado, Laudo, pelo amor, carinho, paciência e incentivos.

Ao Professor Rômulo pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

Ao meu orientador, Professor Jenner, pelos ensinamentos, confiança, oportunidades e incentivos.

Aos membros do Retrolab, Gissandra, Daniela, Fabiana, Helen, Cairo, Juliana, André e Paula pelo companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG por todos os auxílios e ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Ao Professor Sidnei Sakamoto, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pelo fornecimento de amostras de soro de asininos ao banco de Soros do Retrolab.

Aos membros do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV-LANAGRO-MG), Marcelo Fernandes Camargos, Anapolino Macedo de Oliveira, Aládio Lopes de Jesus, Érica Issa, Marconi Madureira Thomaz e Lucília Aguiar Rodrigues pela oportunidade de realização, pela recepção, boa convivência e contribuições na execução desse trabalho.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelos ensinamentos e incentivos, principalmente ao Professor Vicente Toledo pela oportunidade de realização das atividades docentes na disciplina de Imunologia Clínica.

Aos professores da Escola de Veterinária por todos os ensinamentos.

À Rejane Silva Diniz e ao Professor João Paulo Haddad pelas análises estatísticas.

Às minhas queridas amigas Janaína, Carolina, Catarina, Rachel, Priscilla e Luciana pelos incentivos e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	12
2.1 Histórico da AIE.....	12
2.2 Estrutura Viral e Resposta Imune.....	12
2.3 Ciclo da doença e Transmissão.....	13
2.4 Diagnóstico e Controle.....	14
2.4.1 IDGA.....	14
2.4.2 ELISA.....	16
2.4.3 Imunoblot.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Locais de realização dos exames.....	17
3.2 Coleta de material.....	17
3.2.1 Obtenção das amostras.....	17
3.3 Diagnóstico sorológico dos animais.....	18
3.3.1 ELISA rgp90.....	18
3.3.2 IDGA.....	18
3.3.2.1 IDGA segundo Portaria 84/1992 do MAPA.....	19
3.3.2.2 IDGA segundo OIE (2008).....	19
3.3.2.3 Critérios para interpretação da IDGA.....	20
3.3.2.4 Estimativa do limite de detecção.....	20
3.3.2.5 Avaliação da influência do tempo de incubação nos resultados da IDGA.....	20
3.3.2.6 Avaliação da ocorrência de reações inespecíficas na IDGA.....	20
3.3.2.7 Avaliação da influência da temperatura no teste IDGA.....	21
3.3.3 Imunoblot.....	21
3.3.4 Análise Estatística.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 ELISA.....	22
4.2 IDGA.....	23
4.2.1 Avaliação do desempenho dos kit A segundo o protocolo para o qual foi padronizado (OIE, 2008).....	23
4.2.2 Avaliação do desempenho do kit A segundo MAPA.....	23
4.2.3 Avaliação da influência do tempo de incubação nos resultados da IDGA.....	27
4.2.4 Avaliação da ocorrência de reações inespecíficas na IDGA.....	28
4.2.5 Avaliação da influência da temperatura na IDGA.....	29
4.3 IDGA X ELISA.....	30
4.3.1 Equídeos.....	30
4.3.2 Equinos.....	31
4.3.3 Muares.....	32
4.3.4 Asininos.....	33
5 CONCLUSÕES	35
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Avaliação do desempenho do kit A com a IDGA realizada segundo OIE.....	23
Tabela 2 -	Avaliação do desempenho do kit A com a IDGA realizada segundo MAPA.....	24
Tabela 3 -	Avaliação da variação do desempenho do kit A com a IDGA realizada segundo	

	MAPA comparada à IDGA realizada segundo OIE.....	24
Tabela 4 -	Amostras de soro de equídeos que desenvolveram resultados negativos no Kit A segundo MAPA.....	25
Tabela 5 -	Estimativa do limite de detecção através da leitura de ponto final de reação positiva na IDGA de soros com diferentes graus de positividade.....	26
Tabela 6 -	Amostras de soro de equídeos que persistiram com resultados conflitantes entre os leitores na IDGA MAPA e OIE (2008) com os Kits A e B.....	27
Tabela 7 -	Total de amostras positivas e negativas após 24 e 48 h de incubação.....	28
Tabela 8 -	Total de amostras positivas e negativas após 24h, 36h, 48h, 72h e 96h de incubação...	28
Tabela 9 -	Ocorrência de reações inespecíficas ou não identidade na IDGA.....	29
Tabela 10 -	Influência da temperatura no resultado da IDGA.....	30
Tabela 11 -	Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA rgp90 para amostras de soro de equídeos.....	31
Tabela 12 -	Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA rgp90 para as amostras de soro de equinos.....	31
Tabela 13 -	Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA rgp90 para as amostras de soro de muares.....	32
Tabela 14 -	Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA rgp90 para as amostras de soro de asininos.....	33
Tabela 15 -	Amostras de soro de asininos submetidas ao Imunoblot para confirmação dos resultados discordantes entre IDGA e ELISA.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organização genômica do EIAV.....	13
Figura 2 -	Partícula viral do EIAV demonstrando as principais proteínas estruturais e funcionais	13
Figura 3 -	IDGA demonstrando as linhas de precipitação formadas entre Ag p26 e anticorpos anti-EIAV.....	15
Figura 4 -	Imunoblot para AIE demonstrando anticorpos reagentes contra as proteínas do EIAV gp90, gp45 e p26.....	17
Figura 5 -	Lâmina de IDGA demonstrando rosetas com orifício central para o antígeno (A) e orifícios periféricos alternando entre amostras e soro padrão (SP).....	19
Figura 6 -	Placa de Petri para IDGA demonstrando rosetas com orifício central para o antígeno (A) e orifícios periféricos alternando entre amostras e soro padrão (SP).....	19
Figura 7 -	Série de reações esperadas na IDGA (Teste de Coggins) e exemplos de linhas	

inespecíficas.....	20
Figura 8 - Exemplos de linhas de precipitação da IDGA formadas nos Kits A segundo MAPA e OIE e Kit B segundo MAPA.....	25
Figura 9 - IDGA com linhas de precipitação não identidade com o controle positivo.....	29

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Certificado CETEA 013/2010.....	42
Anexo 2	Portaria 84/1992 do MAPA.....	43
Anexo 3	OIE Terrestrial Manual 2008 – Chapter 2.5.6. Equine Infectious Anaemia.....	50
Anexo 4	Portaria 495/2010 do MAPA.....	55

RESUMO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma das enfermidades mais importantes que acomete os equídeos em todo o mundo. O diagnóstico sorológico é a principal forma de se detectar a doença no rebanho, uma vez que os sinais clínicos não são exclusivos. A partir da identificação desses animais infectados pelo EIAV, medidas de controle sanitário devem ser adotadas, tais como segregação e eutanásia. O método diagnóstico oficial da AIE no Brasil é a IDGA (imunodifusão em gel de ágar) (BRASIL, 2004). Dois kits de IDGA estão disponíveis comercialmente no Brasil, sendo um kit importado (kit A) e outro nacional (kit B). O kit A foi padronizado segundo as recomendações da OIE (2008) e o kit B foi padronizado segundo as recomendações da Portaria 84/1992 do MAPA. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de perda de sensibilidade analítica ao utilizar o kit A seguindo as recomendações do MAPA. Foi avaliado o desempenho do kit B segundo as recomendações do fabricante (MAPA, 1992) como também do kit A, seguindo as recomendações da OIE (2008). Os resultados encontrados mostraram boa concordância entre os kits, no entanto não foi possível detectar 1,16% de amostras fracas positivas na IDGA com o kit A segundo Portaria 84/1992. No presente estudo também foi avaliada a concordância entre IDGA e ELISA rgp90 no diagnóstico da AIE. Foi verificado que a concordância foi substancial para equinos e muares, no entanto, ligeira concordância foi encontrada para os asininos.

Palavras chave: AIE, IDGA, ELISA

ABSTRACT

Equine infectious anemia (EIA) is one of the most important diseases of horse with worldwide distribution. The serological diagnosis is the main way to detect the EIA, once clinical signs of the disease are not unique. After identification of infected animals, sanitary control measures should be adopted, such as segregation and euthanasia. The official method for diagnosis of EIA in Brazil is the AGID (agar gel immunodiffusion test) - (BRAZIL, 2004). Two AGID kits are commercially available in Brazil, one imported (kit A) and one national (kit B). The kit A was standardized according to the OIE (2008) recommendations and the kit B was standardized according to the Portaria 84/1992 of MAPA recommendations. The aim of this study was to evaluate the possibility of loss of analytical sensitivity by using the kit A following MAPA recommendations. It was evaluated the performance of kit B according to manufacturer's instructions (MAPA, 1992) and also was evaluated kit A following the OIE's (2008) instructions. The results demonstrated good agreement between both kits, however was not possible to detect 1.16% of weak positive sample in AGID using kit A according to MAPA instructions. This study also evaluated the correlation between AGID and ELISA rgp90 in EIA diagnosis. The agreement between both techniques was substantial for horses and mules, however, slight agreement was found for donkeys.

Key words: EIA, AGID, ELISA

1 INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma doença causada por um lentivírus pertencente à família *Retroviridae*, sendo considerada uma das doenças mais importantes que afetam os equídeos em todo o mundo. A AIE ocorre somente em animais da família Equídea (equinos, muares e asininos) sendo mais prevalente em áreas de clima quente e úmido, refletindo a forma mais comum de transmissão, através de insetos hematófagos, que são essencialmente vetores mecânicos (Issel et al., 1988).

A AIE não tem tratamento nem vacina eficaz, portanto o seu controle é feito através do diagnóstico laboratorial com a identificação, isolamento e eutanásia ou segregação dos animais soropositivos. Várias técnicas de diagnóstico foram desenvolvidas ao longo dos anos para a detecção de animais infectados pelo EIAV, quando em 1970 foi descrita a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar – IDGA, também conhecida como teste de Coggins. Esse teste foi considerado o primeiro teste confiável para detectar anticorpos específicos contra o vírus da AIE disponível em um formato comercial (Issel e Coggins, 1979). A IDGA é uma técnica sensível e a única que apresenta correlação com a presença do vírus em animais experimentalmente infectados pelo EIAV (Pearson et al., 1971; Coggins et al., 1972) sendo, por esse motivo, o método oficial de diagnóstico da AIE em diversos países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2004).

O protocolo da IDGA recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008) utiliza um volume de 50µL de antígeno, soros controle e amostras, distribuídos em orifícios com diâmetro de 5.4 mm, em uma placa de Petri de 100 mm de diâmetro, com 15-17 mL de gel. Os fabricantes de kits de IDGA importados padronizam seus testes segundo essas

orientações. No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1992) preconiza a utilização de lâminas de microscopia com um volume de 4,5 mL de gel e orifícios com 4 mm de diâmetro que possuem capacidade para acomodar 25µL dos reagentes, segundo Nakajima (1970) que fez uma adaptação da técnica original descrita por Coggins em 1970, contrariando as recomendações dos fabricantes de kits importados. Acredita-se que há redução da sensibilidade analítica ao utilizar kits de IDGA padronizados de acordo com as recomendações internacionais, porém, submetidos ao protocolo preconizado pela Portaria 84/1992 do MAPA. A perda de sensibilidade poderia ocorrer devido à maior dificuldade em se visualizar as linhas de precipitação formadas no gel de ágar ao utilizar os volumes menores de reagentes e em lâminas de microscopia.

A perda de sensibilidade pode ser ainda mais expressiva no caso do diagnóstico da AIE em asininos que apresentam reações fracas positivas na IDGA e normalmente são detectados mais tardiamente que os equinos neste teste (Cook et al., 2001). Na década de 80, na França, foi atribuído a um jumento o ressurgimento de um foco de AIE num rebanho considerado livre da doença após 6 anos de medidas de controle. Esse animal havia sido considerado negativo para AIE por ter apresentado fracas reações na IDGA (Toma, 1980).

A não identificação de animais positivos constitui um fator para a manutenção da AIE nos rebanhos. Esse aspecto, associado à possibilidade de considerável perda de sensibilidade da IDGA ao utilizar volumes menores de reagentes, torna-se um importante objeto de estudo a ser investigado, uma vez que o controle da AIE pode não estar sendo efetivo no Brasil.

Dessa forma, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar a diferença de

sensibilidade entre dois kits de IDGA utilizados no diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina no Brasil segundo dois protocolos, um preconizado pela OIE (2008) e outro pela Portaria 84/1992 do MAPA por meio de validação da técnica.

O presente estudo também avaliou a concordância entre IDGA e ELISA rgp90 no diagnóstico da AIE nas espécies equina, muar e asinina realizando imunoblot para elucidação de eventuais discordâncias entre as duas técnicas.

2 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1 Histórico da AIE

A AIE foi identificada como doença em 1843 por Lignéé, na França, sendo a primeira doença animal associada à etiologia viral (Vallé e Carré, 1904). No Brasil, ela foi verificada pela primeira vez em 1968 no extinto estado de Guanabara por Dupont et al. (1968). No mesmo período a doença foi descrita por Silva et al. (1968) em animais do Clube Hípico Fluminense e em um animal da cavalaria da Polícia Militar na cidade de Niterói, no estado do Rio de Janeiro. Ainda em 1968, Guerreiro et al. também descreveram o primeiro caso no Estado do Rio Grande do Sul. Em Minas Gerais, o primeiro caso foi diagnosticado em 1968, em um cavalo na Vila Hípica de Belo Horizonte. Porém, somente em 1971, com base nos exames clínicos, anátomo-patológicos, laboratoriais e inoculação do sangue suspeito em animal sadio, o resultado foi publicado, citando também a comprovação de mais 18 casos em equídeos do Jockey Club de Minas

Gerai (Batista Junior e Fonseca, 1971). Segundo levantamento soropidemiológico realizado por Almeida et al. (2006), Minas Gerais foi considerada área endêmica para AIE, com uma prevalência de 5,3% para rebanhos e 3,1% para animais. As mais altas prevalências para rebanhos de serviço foram encontradas na região Norte/Nordeste (14,9%) e região Vale do Mucuri/Jequitinhonha (12,5%).

Apesar da identificação do EIAV ter sido realizada no início século XX, a sua caracterização só foi possível após vários anos devido a dificuldades de isolamento e propagação do vírus em cultivo celular. Somente em 1970 foi descrito o teste de imunodifusão, também conhecido como teste de Coggins, para o diagnóstico da AIE (Coggins e Norcross, 1970), sendo, desde então, a IDGA o método oficial para o diagnóstico da AIE no Brasil e em diversos países do mundo. Atualmente, o foco dos estudos da AIE tem se concentrado no desenvolvimento de políticas regulatórias, desenvolvimento e avaliação de métodos diagnósticos que possibilitem a identificação precoce e a eliminação dos animais infectados pelo EIAV.

2.2 Estrutura Viral e Resposta Imune

O EIAV é um membro do gênero *Lentivirus* e da família *Retroviridae* (ICTV, 2009). Em sua estrutura viral há três principais genes estruturais e funcionais: o gene *gag* codifica as proteínas do core viral p26, p15, p11 e p9; o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, integrase e protease e o gene *env* codifica as glicoproteínas transmembrana gp45 e de superfície gp90. (Fig. 1 e 2).

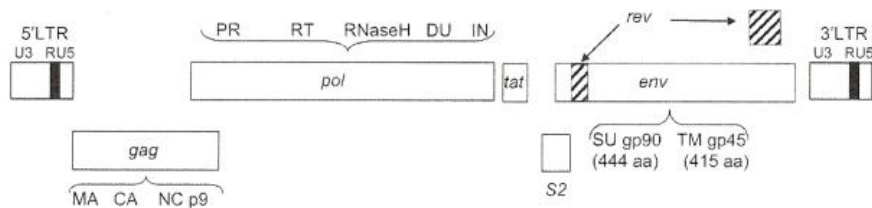


Figura 1: Organização genômica do EIAV (Leroux, 2004)

Os lentivírus induzem infecção persistente em seus hospedeiros naturais, que é atribuída à integração do genoma do vírus e latência. Variações antigênicas nas proteínas de superfície da partícula viral permitem o escape ao sistema imunológico do hospedeiro, sendo um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas (Montelaro et al., 1984). Para o EIAV, as mutações determinantes do escape viral estão relacionadas com a glicoproteína gp90.

A resposta imune dos equídeos ocorre predominantemente contra as glicoproteínas do envelope viral, gp90, e transmembrana, gp45, como também contra a principal proteína do core viral, a p26 (Fig. 2). A maioria dos métodos diagnósticos aprovados são para a pesquisa dos anticorpos anti-p26, embora o título de anticorpos contra as glicoproteínas ser pelo menos dez vezes maior do que o título de anticorpos anti p26 (Craig e Montelaro, 2008).

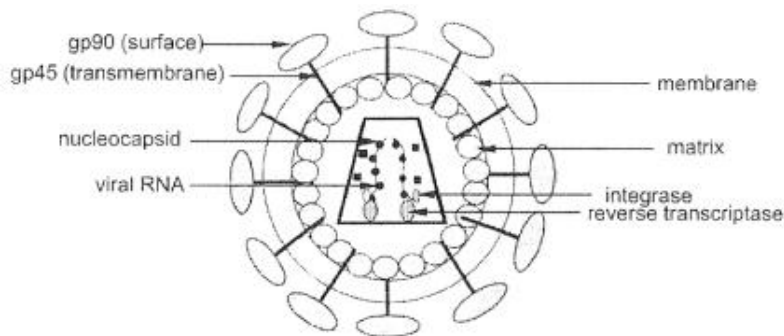


Figura 2: Partícula viral do EIAV demonstrando as principais proteínas estruturais e funcionais (Leroux, 2004)

2.3 Ciclo da doença e Transmissão

O EIAV é responsável por uma infecção persistente em equídeos sendo caracterizada por ciclos recorrentes de viremia associados a episódios clínicos com febre, anemia, edema, e trombocitopenia (Leroux, 2004). Os sinais clínicos da AIE são variáveis e irão depender da dose e virulência da amostra infectante, como também da susceptibilidade individual do hospedeiro (Sellon, 1993). Apesar disso, a resposta clínica dos equídeos seguida por infecção natural ou experimental com o EIAV pode

ser dividida em três fases: aguda, crônica e inaparente. Durante os dois primeiros estágios os sinais mais evidentes são episódios febris recorrentes, anemia hemolítica, anorexia, rápida perda de peso, hemorragias e edema ventral. Se o animal sobrevive, os episódios da doença progressivamente diminuem até que o animal entra na fase inaparente onde os sinais clínicos são ausentes (Issel e Coggins, 1979; Cook e Issel, 2009).

No campo a maioria dos cavalos positivos para AIE estão na fase inaparente e quando

não identificados continuam no rebanho servindo como reservatórios e fonte de disseminação da doença. Os asininos, apesar de serem susceptíveis ao EIAV, podem apresentar níveis de viremia muito baixos, o que poderia explicar o fato de não demonstrarem, usualmente, os sinais clínicos da enfermidade (Cook et al., 2001). Segundo Spyrou et al. (2003), os achados clínico - patológicos e laboratoriais, mostram que os muares produzem sinais clínicos semelhantes aos observados em equinos.

O sangue de cavalos persistentemente infectados é a fonte mais importante de transmissão do EIAV, que pode ser transferido por insetos hematófagos da ordem Diptera: *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp, *Tabanus* sp, *Hybromitra* spp, sendo os *Tabanus* sp, os principais responsáveis pela transmissão (Cook e Issel, 2009). Evidências de transmissão do EIAV *in utero* da égua para o potro são muito raras. O EIAV tem mostrado ser viável em agulhas contaminadas por mais de 96 horas, enfatizando o potencial de transmissão através de manejo dos animais e práticas veterinárias no rebanho (Craig e Montelaro, 2008).

2.4 Diagnóstico e Controle

Até a década de 60 as pesquisas com o EIAV eram limitadas pela falta de sistemas confiáveis *in vitro* para seu isolamento, propagação e quantificação (Montelaro et al., 1993). Dessa forma, o diagnóstico era realizado através da inoculação do EIAV em cavalo sadio e consequente observação do surgimento de sinais clínicos característicos. Vários testes foram desenvolvidos para detectar a doença: inibição da hemaglutinação, fixação de complemento (Kono e Kobayashi, 1966), imunofluorescência em estudo demonstrado por Ushimi et al. em 1970, imunodifusão em gel de agar (Coggins, 1970), estudos de soroneutralização (Kono et al., 1971),

ensaio imunoenzimático (Shen e McGuire, 1984), Western Blot (Rossmanith e Horvath, 1989). Testes moleculares para a detecção do genoma do EIAV foram recentemente desenvolvidos, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (Lichtenstein et al., 1995; Cook et al., 2002; Quilivan et al., 2007).

A AIE é uma doença que não possui tratamento nem vacina eficaz, portanto, seu controle ocorre basicamente pela identificação, segregação e eutanásia dos animais soropositivos para o EIAV através do uso de métodos diagnósticos aprovados. No Brasil e em vários países do mundo, o método diagnóstico oficial para o diagnóstico da AIE é a IDGA ou teste de Coggins (Brasil, 2004; OIE, 2008). A partir de 1980, o USDA (*United States Department of Agriculture*) aprovou o uso de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), devido à alta sensibilidade, como método de triagem, sendo que os animais que desenvolvem resultados positivos no ELISA devem ser confirmados na IDGA (Issel e Cook, 1993; Craig e Montelaro, 2008).

2.4.1 IDGA

O teste sorológico de imunodifusão para o diagnóstico da AIE usando a proteína do core viral p26 foi descrito por Coggins e Norcross em 1970.

Durante os estudos, eles utilizaram antígeno derivado de baço de um pônei infectado experimentalmente com o EIAV. A reação de imunodifusão foi realizada em placa de Petri com amostras de soro do próprio pônei coletadas antes e após a inoculação do vírus.

O princípio do teste consiste numa migração simultânea do antígeno e do anticorpo em sentido convergente em ágar gel formando complexos antígeno-

anticorpo insolúveis que precipitam, tornando-se visíveis sob a forma de linha de

precipitação (Fig. 3).

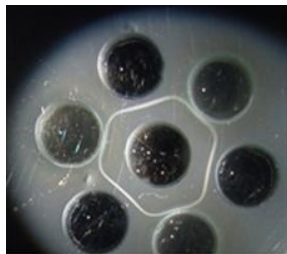


Figura 3: IDGA demonstrando as linhas de precipitação formadas entre Ag p26 e anticorpos anti-EIAV (<http://dept.ca.uky.edu/eia/diagnosis.aspx>)

Também em 1970, pesquisadores japoneses desenvolveram procedimentos de purificação e concentração do EIAV cultivado em cultura de leucócitos. A IDGA foi realizada em lâmina de microscopia utilizando soros de animais experimentalmente infectados com o EIAV como amostras (Nakajima e Ushimi, 1970).

Apesar da IDGA ter sido considerada uma revolução no diagnóstico da AIE, o preparo de grandes quantidades de antígeno em concentrações adequadas para se obter linhas de precipitação visíveis permaneceu como fator complicador por alguns anos. Em 1973, Malmquist e colaboradores conseguiram produzir antígeno de AIE a partir de cultura de células de derme equina infectadas pelo EIAV. A IDGA foi realizada em lâminas de microscopia utilizando amostras de soros obtidas de animais naturalmente infectados com o EIAV e um soro de animal experimentalmente infectado como referência. Também em 1973, Nakajima et al. aprimoraram a técnica de purificação de antígeno a partir de cultura de leucócitos para a produção em larga escala de antígenos para IDGA. Eles também demonstraram a presença do vírus em diferentes órgãos de um cavalo experimentalmente infectado. Simultaneamente, Ueda et al. (1973) realizaram um estudo comparativo entre

IDGA realizada em placa de Petri utilizando antígeno derivado de baço de cavalo experimentalmente infectado pelo EIAV e IDGA realizada em lâmina de microscopia utilizando antígeno purificado a partir de cultura de leucócitos purificado por um método mais simples daquele descrito por Nakajima (1970). Foi concluído que os dois antígenos apresentaram reações idênticas com os soros testados, indicando que o determinante antigênico é comum em ambas preparações.

Atualmente, o antígeno em uso na IDGA geralmente tem origem na tecnologia de produção de antígenos recombinantes. O antígeno recombinante possui produção menos onerosa, com facilidade de se obter em concentrações suficientes para desenvolver nítidas linhas de precipitação com o soro referência positivo e devido a sua pureza, desenvolve menos reações inespecíficas (Issel e Cook, 2004; Alvarez et al., 2007; Piza et al., 2007).

Um resultado positivo na IDGA é confiável e confirma a presença do EIAV no animal. Animais infectados produzem anticorpos contra as proteínas do EIAV em torno de 12 dias pós infecção, mas geralmente apresentam resultados positivos na IDGA somente 15-25 dias após inoculação do vírus. No entanto, também há relato de um

animal que desenvolveu seu primeiro teste positivo na IDGA 45 dias pós-infecção (Coggins et al., 1972; Issel e Cook, 1993). Em um surto na Irlanda em 2007, houve relatos de períodos de incubação de 157 dias (Cullinane et al., 2007).

Uma das limitações da IDGA está relacionada à sua sensibilidade, onde amostras com baixos títulos de anticorpos apresentam leituras difíceis de serem realizadas contribuindo para a ocorrência de resultados falsos negativos, já que a leitura é visual e subjetiva, sujeita a erros de interpretação. Outra causa de resultados falsos negativos ocorre quando amostras de soro são coletadas de animais no primeiro episódio clínico induzido pela infecção pelo EIAV, pois os animais não tiveram tempo suficiente para montar a resposta imune contra a p26 (Issel e Cook, 1993). Sabe-se que os asninomalmente apresentam níveis de viremia e, conseqüentemente de anticorpos, inferiores aos dos equinos com formação de linhas de precipitação bastante tênues na IDGA (Cook, 2001 e dados pessoais). Como em algumas regiões do Brasil o número de asninomais é expressivo, o controle da AIE baseado no diagnóstico pela IDGA pode estar comprometido nestas áreas, sendo necessário um estudo nesta espécie para se estimar o grau de sensibilidade dos kits disponíveis.

2.4.2 ELISA

Testes de ELISA para AIE têm sido desenvolvidos e aprovados em alguns países, apresentando boa correlação com o teste IDGA e melhor sensibilidade em muitos casos, principalmente na detecção de animais positivos em uma fase mais inicial da infecção (Susuki et al., 1982; Shane et al., 1984; Shen et al., 1984; Lew et al., 1993; Soutullo et al., 2001). Nos Estados Unidos, um modelo de ELISA

competitivo (CELISA) para detecção de anticorpos anti-p26 foi aprovado para uso ainda na década de 80. Atualmente, mais outros três kits de ELISA não competitivos estão aprovados pelo USDA para diagnóstico da AIE, sendo que dois kits utilizam a p26 como antígeno e um terceiro utiliza simultaneamente a p26 e a glicoproteína transmembrana gp45 (OIE, 2008).

O ELISA possui a vantagem de ter menos subjetividade na leitura dos seus resultados, que pode ser eliminada com a utilização de espectrofotômetros (Issel e Cook, 1993). A limitação do ELISA está relacionada à ocorrência de resultados falsos positivos com maior frequência, sendo necessário confirmar o diagnóstico na IDGA (OIE, 2008).

Em 1997, Reis et al. desenvolveram um ELISA utilizando a glicoproteína recombinante gp90 detectando anticorpos anti EIAV mais precocemente do que o ELISA que utiliza a proteína p26. Segundo Martins (2004), o ELISA rgp90 é mais sensível que a IDGA sendo dessa forma um bom teste de triagem para ser utilizado em grandes levantamentos soro epidemiológicos, além de detectar soros que apresentam reações fracas positivas na IDGA. Outro trabalho recente demonstrou que o ELISA rgp90 pode ser considerado como método alternativo no diagnóstico da AIE no Pantanal Mato-grossense, uma vez que esta enfermidade apresenta alta prevalência nessa região (Nogueira et al., 2009).

2.4.3 Imunoblot

O imunoblot para AIE é uma importante ferramenta de pesquisa utilizada para explicar casos em que há discordância entre os resultados da IDGA e ELISA (Fig. 4).

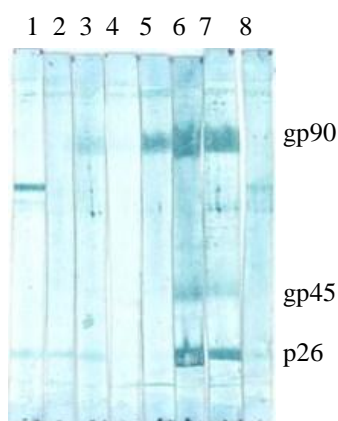


Figura 4: Imunoblot para AIE demonstrando anticorpos reagentes contra as proteínas do EIAV gp90, gp45 e p26

O imunoblot é um dos métodos sorológicos mais sensíveis, pois detecta simultaneamente reação de anticorpos anti-gp90, anti-gp45 e anti-p26 com as respectivas proteínas virais (Issel et. al., 1999). O imunoblot possibilita a confirmação do *status* imunológico do animal infectado pelo EIAV, pois é utilizado como ferramenta de estudo da cinética da resposta imune dos equídeos com AIE (Issel e Cook, 1993). Esse método não está disponível comercialmente, no entanto, tem sido usado como ferramenta auxiliar no diagnóstico da AIE no laboratório referência da Universidade de Kentucky, nos Estados Unidos

Cuidados na interpretação do imunoblot devem ser tomados. Considera-se resultado positivo para AIE no imunoblot somente amostras que possuem anticorpos reagentes contra pelo menos uma das glicoproteínas (gp90 ou gp45) e contra a proteína do core viral p26 simultaneamente. Amostras que reagem somente com a p26 no imunoblot não são consideradas positivas porque ligações não específicas a essa proteína tem sido descritas devido ao seu alto grau de conservação entre os retrovírus e à exposição ocasional do animal a outros lentivírus (Burki et al., 1992; Issel e Cook, 2004). Similarmente, amostras que reagem somente com a gp90

também são consideradas negativas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo teve aprovação do CETEA-UFMG (Comitê de Ética de Experimentação Animal), sob o número 130/2010, validade 11/agosto/2015, para sua realização (ANEXO 1).

3.1 Locais de realização dos exames

Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG).

3.2 Coleta de material

3.2.1 Obtenção das amostras:

Foi utilizado um total de 345 amostras de soro de equídeos sendo 106 de equinos, 105 de muare e 122 de asininos que compõem o banco de soros de equídeos do Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da

UFMG. Essas amostras de sangue total foram coletadas em diversos rebanhos do território brasileiro. As demais 12 amostras de soros de equídeos utilizadas foram gentilmente cedidas pelo LANAGRO-MG. Entre essas amostras, 10 eram amostras da rotina laboratorial com resultados conhecidos e uma era soro referência fraco positivo importado do laboratório de referência para AIE do USDA (NVSL – *National Veterinary Services Laboratories*) em Ames, EUA. O soro referência foi alíquotado e identificado com dois números diferentes e submetido à IDGA em dias diferentes.

3.3 Diagnóstico sorológico dos animais

3.3.1 ELISA rgp90

O ELISA rgp90 indireto foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Reis (1997). Esse teste foi utilizado como ferramenta de triagem de amostras de soro dos equídeos no presente estudo.

A proteína rgp90 foi diluída em tampão carbonato 50 mM (pH 9,6), na concentração de 0,5µg/cavidade e incubada em placas de ELISA de 96 cavidades (Nunc-Immuno Plate Maxisorp) por 18 h a 4° C. As placas foram lavadas por duas vezes com salina tamponada (pH 7,0) contendo Tween 20 a 0.05% (PBS-Tween) e então incubadas por 1 h com solução de bloqueio constituída de leite em pó desnatado a 5% em PBS-Tween. Nova lavagem foi realizada (3 vezes) e o soro na diluição 1:50 foi incubado por 1 h a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS-Tween por 3 vezes e incubadas com solução de conjugado na diluição 1:10.000 (anticorpo secundário anti-IgG equina conjugado com peroxidase –Sigma) por 1 h a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS-Tween por três vezes, adicionou-se o substrato: solução de o-fenilenodiamina (OPD) (0,5 mg/mL) e

peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tampão fosfato-citrato (pH 5,0) por 10 min em temperatura ambiente. As reações foram interrompidas com solução de ácido sulfúrico 1N e as densidades ópticas foram lidas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492 nm.

3.3.2 IDGA

Todas as amostras de soro dos equídeos foram submetidas ao teste oficial para diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina, IDGA, segundo Coggins e Norcross (1970). Foram utilizados dois kits comerciais. O kit A, importado, padronizado segundo recomendações da OIE, lote 001/10. O kit B, nacional, padronizado segundo Portaria 84/1992 do MAPA, partida 004/10. O kit A foi submetido ao protocolo da OIE (OIE, 2008) e ao protocolo preconizado pelo MAPA (MAPA, 1992); o kit B foi submetido somente ao protocolo do MAPA. Para ambos os kits e protocolos utilizaram-se as mesmas amostras de soro dos equídeos selecionadas durante a triagem pelo ELISA rgp90. Todo o experimento foi executado em local onde a temperatura ambiente foi monitorada, tendo a média de 21,09°C com intervalo de confiança de 95% variando de 20,20 a 21,98°C.

Utilizou-se ensaio cego onde foram realizadas leituras e interpretações independentes, com 24 e 48 h de incubação, por pelo menos dois analistas certificados e com experiência em leitura de IDGA. Um experimento piloto foi desenvolvido para permitir uma familiarização dos analistas aos ensaios da IDGA com os dois kits nos dois diferentes protocolos. As amostras foram codificadas para se evitar tendências de resultados durante as leituras. Em casos de discordância de interpretação entre os leitores, a amostra foi retestada. Amostras onde persistiram resultados discordantes entre os leitores, foram submetidas ao Imunoblot para confirmação e retiradas da análise estatística.

3.3.2.1 IDGA segundo Portaria 84/1992 do MAPA (ANEXO 2)

A solução de ágar Noble 1% em Tampão Borato foi preparada em microondas e distribuída (4,5 mL) em lâmina de microscopia (25x75mm). Após sua solidificação o ágar foi perfurado com um furador próprio que contém um orifício central e seis periféricos medindo 4mm de diâmetro e 3mm de distância entre os mesmos. Os soros testados foram colocados

(25µL) intercalados com os soros controles positivos nos orifícios periféricos e o antígeno (25µL) foi colocado no orifício central (Fig. 5). As lâminas foram incubadas em câmara úmida, em temperatura entre 20° e 25°C, por 48 h e lidas a olho nu ou com o auxílio de uma lupa para a verificação da presença de linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste com identidade com soro controle positivo. Foi utilizada uma fonte de luz indireta durante as leituras sob fundo escuro.

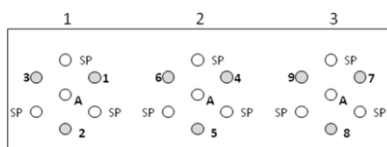


Figura 5: Lâmina de IDGA demonstrando orifício central para o antígeno (A) e orifícios periféricos alternando entre amostras e soro padrão (SP)

3.3.2.2 IDGA segundo OIE (2008) (ANEXO 3)

A solução de ágar Noble 1% em Tampão Borato foi preparada em microondas e distribuída (17 mL) em placa de Petri (100x20mm). Após sua solidificação o ágar foi perfurado com um furador próprio que contém um orifício central e seis periféricos medindo 5,3mm de diâmetro e 2,4mm de distância entre os mesmos. Os soros a

serem testados foram colocados (50µL) intercalados com os soros controles positivos nos orifícios periféricos e o antígeno (50µL) foi colocado no orifício central (Figura 6). As placas foram incubadas em câmara úmida, em temperatura entre 20° e 25°C, por 48 h e lidas a olho nu ou com o auxílio de uma lupa para a verificação da presença de linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste. Foi utilizada uma fonte de luz indireta durante as leituras sob fundo escuro.

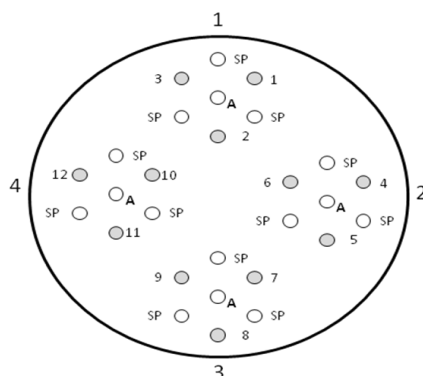


Figura 6: Placa de Petri para IDGA demonstrando rosetas com orifício central para o antígeno (A) e orifícios periféricos alternando entre amostras e soro padrão (SP)

3.3.2.3 Critérios para interpretação da IDGA

Para a leitura e interpretação das linhas de precipitação na prova de IDGA, adotou-se o sistema de leitura recomendado pelo NVSL (2003) disponível em <http://dept.ca.uky.edu/eia/documents/160.pdf>. Para registrar os resultados na ficha de leitura, segundo Fig. 7, utilizaram-se as seguintes notações: “+” = reação positiva,

“-” = reação negativa, “I” = resultados inconclusivos e “NSL” = linhas não específicas, do inglês *nonspecific line*. Os resultados positivos foram reportados de acordo com a intensidade da linha de precipitação formada utilizando uma escala numérica: “+5” = reação muito forte positiva, “+4” = reação forte positiva; “+3” = reação positiva, “+2” = reação positiva, “+1” = reação fraca positiva e, “vw” = reação muito fraca positiva, do inglês *very weak positive* (NVSL, 2008).

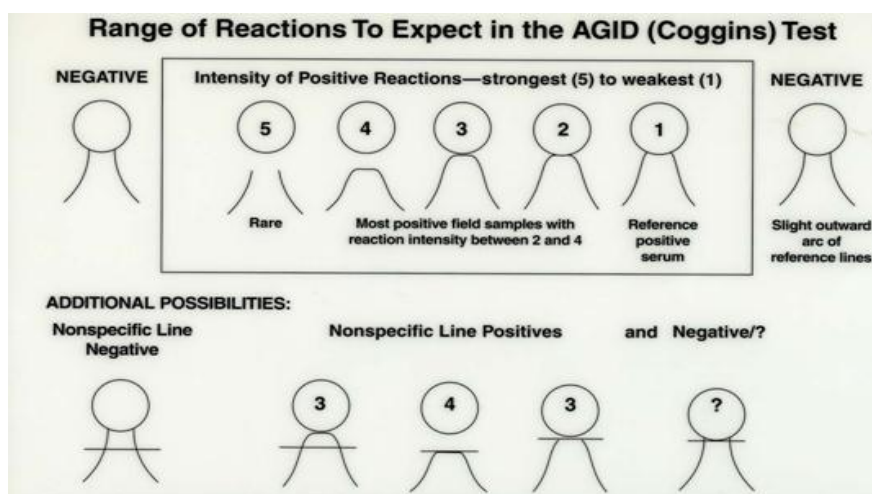


Figura 7: Série de reações esperadas na IDGA (Teste de Coggins) e exemplos de linhas inespecíficas

3.3.2.4 Estimativa do limite de detecção

Para a estimativa de limite de detecção dos kits de IDGA utilizados e submetidos aos dois protocolos do MAPA (1992) e OIE (2008) foram utilizadas amostras positivas com diferentes níveis de positividade (+1, +2, +3 e +4) sem diluir e em diluição seriada na base dois (1:2 - 1:256). O mesmo procedimento foi realizado com soro referência fraco positivo do USDA.

3.3.2.5 Avaliação da influência do tempo de incubação nos resultados da IDGA

As leituras da IDGA foram realizadas após 24 e 48 h de incubação. Foram contabilizados todos os resultados positivos e negativos nos dois tempos de incubação para a IDGA realizada com o kit A segundo Portaria 84/1992 do MAPA e OIE (2008) e kit B segundo o primeiro protocolo.

Outras 30 amostras positivas e 30 negativas para AIE foram submetidas à IDGA com o kit B segundo Portaria 84/1992 do MAPA e as leituras dos resultados foram realizadas após 24, 36, 48, 72 e 96 h de incubação.

3.3.2.6 Avaliação da ocorrência de reações inespecíficas na IDGA

Foram contabilizadas todas as reações inespecíficas ou não identidade que ocorreram durante o teste de IDGA das 345 amostras de soro de equídeos utilizadas no experimento quando se utilizou o kit A e B segundo Portaria 84/1992 do MAPA e quando se utilizou o kit A segundo OIE (2008) após 48 h de incubação.

3.3.2.7 Avaliação da influência da temperatura na IDGA

Para essa análise, foram utilizadas 10 amostras positivas e 10 amostras negativas para AIE e o Kit B segundo Portaria 84/1992 do MAPA. As temperaturas para as quais a reação de IDGA foi submetida foram: 4-8°C; 15°C; 20-25°C; 30°C e 37°C.

3.3.3 Imunoblot

As membranas de nitrocelulose para o imunoblot foram gentilmente cedidas pelo Prof. Charles J. Issel (Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington, KY, EUA). As mesmas foram preparadas segundo Cook et al. (2005).

Três amostras que tiveram resultados persistentemente conflitantes entre os leitores do teste IDGA foram submetidos ao imunoblot para confirmação. Outras 40 amostras que tiveram resultados conflitantes entre IDGA e ELISA foram também submetidas ao imunoblot para confirmação, sendo que 35 foram amostras de soro provenientes de asininos.

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas em PBS com 5% de leite desnatado por 1 h a temperatura ambiente e sob agitação. Após essa etapa, as membranas foram cortadas em tiras de 4 mm de largura e incubadas com os soros diluídos 1:20 em PBS com 1% de leite em pó desnatado durante 1 h, sob agitação, à temperatura ambiente, seguido por quatro lavagens com PBS saturado com NaCl acrescido de 0,05% Tween 20. O conjugado

(anticorpo secundário anti-IgG equina conjugado com peroxidase –Sigma) foi diluído 1:1500 em PBS com 1% de leite em pó desnatado e incubado com as tiras da membrana durante 1 h, sob agitação. Lavou-se durante 10 minutos com PBS saturado com NaCl acrescido de 0,05% de Tween 20. Depois, lavou-se novamente por 10 minutos, com PBS saturado com NaCl. Por último, lavou-se com PBS durante mais 10 minutos. Todas as lavagens foram realizadas sob agitação. Adicionou-se o substrato de TMB (Promega), incubando as amostras por 5 minutos protegidos da luz. Retirou-se o substrato e adicionou-se água destilada para parar a reação. As membranas foram secadas em papel de filtro antes da visualização das reações.

3.3.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa STATA versão 10.0. A avaliação dos testes diagnósticos foi feita segundo Dohoo et al. (2003). Todos os dados relativos à sensibilidade comparada foram avaliados de acordo com o método “Tabela de Contingência” – X^2 (teste qui-quadrado). O nível de significância estatística estabelecido para as comparações foi de 5% ($p \leq 0,05$). A quantificação da concordância entre as leituras dos testes de IDGA nos diferentes protocolos, bem como a concordância entre IDGA e ELISA foi determinada através do índice Kappa, com intervalo de confiança (IC) de 95 %.

A IDGA realizada com o Kit B de acordo com a Portaria 84/1992 do MAPA foi utilizada como referência nas comparações com a IDGA realizada com o kit A segundo Portaria 84/1992 do MAPA; IDGA com o kit A segundo OIE (2008) e ELISA rpg 90 segundo Reis (1997). As instruções dos fabricantes seguem as legislações regulamentadoras de cada país.

No presente estudo, várias amostras de soro utilizadas nos ensaios possuíam os

resultados conhecidos para AIE. Essas amostras foram utilizadas como controles de todo o experimento. Para obter estimativas conservadas de Kappa e determinação das sensibilidades relativas, todas as amostras positivas, que foram utilizadas como controles, e que desenvolveram resultados inconclusivos na IDGA, foram consideradas negativas, conforme realizado por Pará e Simard (2003).

Para a avaliação da influência da temperatura no teste IDGA, os dados foram analisados utilizando o teste exato de Fisher com o programa EpiInfo Versão 6. O nível de significância estabelecido para as comparações foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Para o estudo dos asininos positivos e indeterminados no teste ELISA rgp90 e que tiveram resultados negativos na IDGA, a quantidade de elementos amostrados para representatividade da população foi calculada no programa EpiInfo versão 6, disponível em www.cdc.gov.br. Para o cálculo foi considerada frequência esperada de 20% e erro aceitável de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois kits de IDGA estão disponíveis comercialmente no Brasil, sendo um kit importado (kit A) e outro nacional (kit B). O kit A foi padronizado segundo as recomendações da OIE (2008) e o kit B foi padronizado segundo as recomendações da Portaria 84/1992 do MAPA. Em outubro de 2010, o MAPA publicou a Portaria nº495 (ANEXO 4), que recomenda a execução da IDGA, no caso de utilização de kits importados, de acordo com a instrução do protocolo constante na bula do distribuidor. Na prática, anteriormente a essa data, a IDGA com kits importados era realizada de acordo com a Portaria 84/1992 do MAPA e não de acordo com a instrução da bula do fabricante, que é a mesma instrução da OIE (2008).

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de redução na sensibilidade analítica ao utilizar o kit A, importado, seguindo as recomendações do MAPA. Foi avaliado o desempenho do kit B, nacional, segundo as recomendações do fabricante (MAPA, 1992) como também do kit A, seguindo as recomendações da OIE (2008). Os resultados encontrados possuem boa concordância, apesar dos leitores da IDGA desse trabalho terem relatado dificuldade na leitura das linhas de precipitação formadas entre antígeno e anticorpo quando se utilizou o kit importado, realizado segundo protocolo do MAPA.

Nos resultados foi observada baixa concordância na comparação entre IDGA e ELISA no diagnóstico da AIE em asininos. Dessa forma, outros testes foram realizados na tentativa de elucidar as causas nessa discordância, uma vez que há poucos estudos sobre o diagnóstico laboratorial dessa espécie e, no Brasil, o número de asininos, especialmente em algumas regiões como o nordeste, é bastante significativo.

4.1 ELISA

Do total de 106 amostras de soro de equinos, 53 foram negativas no ELISA, 52 foram positivas e 1 apresentou resultado indeterminado.

Do total de 105 amostras de soro de muas, 47 foram negativas no ELISA, 48 foram positivas e 10 foram indeterminadas.

Do total de 122 asininos, 50 foram negativos no ELISA, 55 foram positivos e os demais 17 tiveram resultado indeterminado.

O soro referência fraco-positivo em IDGA do USDA foi positivo no ELISA.

Das 10 amostras da rotina laboratorial do LANAGRO/MG, três foram positivas no

ELISA, 8 foram negativas e três foram indeterminadas.

4.2 IDGA

4.2.1 Avaliação do desempenho do kit A segundo o protocolo para o qual foi padronizado (OIE, 2008)

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1, referente à comparação dos resultados de 345 amostras de soro de equídeos submetidas à IDGA, utilizando o Kit B realizado segundo Portaria 84/1992 do MAPA, e a IDGA com o Kit A segundo OIE (2008) uma amostra teve o resultado

discordante, sendo positiva com o Kit B no primeiro protocolo e negativa com o Kit A no segundo protocolo. O restante das 344 amostras, 244 foram negativas e 100 foram positivas em ambos os protocolos. O índice kappa encontrado foi de 0,993 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,979 a 1,0 demonstrando concordância quase perfeita nessa análise, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003). A sensibilidade relativa do kit A segundo OIE (2008) foi de 99% (IC de 93,8 a 99,9%). Houve discordância no resultado de apenas uma amostra de soro proveniente de um muar experimentalmente infectado com o EIAV, sendo positiva com o kit B e negativa com o kit A.

Tabela 1 – Avaliação do desempenho do kit A com a IDGA realizada segundo OIE

Kit B(MAPA)	Kit A(OIE)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	100 (VP)	1 (FN)	101
Negativo	0(FP)	244 (VN)	244
Total	100	245	345
Kappa	0,993	Sensibilidade 99%	

VP:verdadeiro positivo VN: verdadeiro negativo FN: falso negativo FP: falso positivo

4.2.2 Avaliação do desempenho do kit A segundo protocolo do MAPA

De acordo com os resultados apresentados na tabela 2, referente à comparação dos resultados de 345 amostras de soro de equídeos submetidas à IDGA, realizada segundo Portaria 84/1992 do MAPA, utilizando os Kits A e B, quatro amostras tiveram os resultados discordantes, apresentando resultados positivos com o Kit B e negativos com o Kit A. O índice kappa

encontrado foi de 0,972 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,944 a 0,999 demonstrando concordância quase perfeita nessa análise, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003). A sensibilidade relativa do kit A segundo Portaria 84/1992 foi de 96% (IC de 89,5% a 98,7%).

Tabela 2 – Avaliação do desempenho do kit A com a IDGA realizada segundo MAPA

	Kit A (MAPA)		Total
Kit B(MAPA)	Positivo	Negativo	
Positivo	97 (VP)	4 (FN)	101
Negativo	0 (FP)	244 (VN)	244
Total	97	248	345
Kappa	0,972	Sensibilidade 96%	

VP:verdadeiro positivo VN: verdadeiro negativo FN: falso negativo FP: falso positivo

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, referente à comparação dos resultados de 345 amostras de soro de equídeos submetidas à IDGA, realizada segundo Portaria 84/1992 do MAPA utilizando o Kit A e submetidas à IDGA segundo OIE (2008) também utilizando o Kit A, três amostras tiveram os resultados discordantes, apresentando resultados negativos com o Kit A no primeiro protocolo (MAPA) e positivos com o Kit A

no segundo protocolo (OIE). O restante das 342 amostras, 245 foram negativas e 97 foram positivas em ambos os protocolos. O índice kappa encontrado foi de 0,979 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,955 a 1,0 demonstrando concordância quase perfeita nessa análise, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003). A sensibilidade relativa do Kit A segundo Portaria 84/1992 foi de 97% (IC de 90,8% a 99,2%).

Tabela 3 – Avaliação da variação do desempenho do kit A com a IDGA realizada segundo MAPA comparada à IDGA realizada segundo OIE

	Kit A(MAPA)		Total
Kit A (OIE)	Positivo	Negativo	
Positivo	97 (VP)	3 (FN)	100
Negativo	0 (FP)	245 (VN)	245
Total	97	248	345
Kappa	0,979	Sensibilidade 97%	

VP:verdadeiro positivo VN: verdadeiro negativo FN: falso negativo FP: falso positivo

Apesar da concordância estimada pelo índice kappa entre a IDGA realizada com o Kit A segundo Portaria 84/1992 do MAPA, com kit B segundo o mesmo protocolo e o kit A segundo OIE (2008) ter sido quase perfeita, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003), pode-se notar que houve redução na sensibilidade ao realizar a IDGA com o kit A seguindo recomendações diferentes daquelas para o qual ele foi padronizado. A IDGA com o kit A segundo Portaria 84/1992 do MAPA falhou na detecção de

1,16% (4/345) de amostras fraco positivas (Tabela 2). As quatro amostras que o kit A segundo protocolo do MAPA foi incapaz de detectar foram submetidas ao imunoblot para confirmação.. Para todas elas o ELISA rgp90 foi verdadeiro positivo e as amostras possuíam anticorpos reagentes simultaneamente contra as principais proteínas do EIAV, gp90, gp45 e p26 no imunoblot (Tabela 4). Apenas uma (amostra 645) foi negativa na IDGA com o kit A segundo protocolo da OIE (2008).

Tabela 4 - Amostras de soro de equídeos que desenvolveram resultados negativos no Kit A segundo MAPA

Amostra	IDGA	IDGA	IDGA	ELISA ¹	Imunoblot ²		
	Kit A(MAPA)	Kit A(OIE)	Kit B(MAPA)		gp90	gp45	p26
630	-	+	+	+	+	+	+
633	-	+	+	+	+	+	+
645	-	-	+	+	+	+	+
835	-	+	+	+	+	+	+

1. ELISA rpg90 segundo Reis (1997)

2. Imunoblot segundo Cook (2005)

A IDGA possui a interpretação dos resultados como positivo e negativo, mas as reações de amostras positivas podem apresentar variabilidade nos níveis de intensidade das linhas de precipitação entre o antígeno e o anticorpo contra a proteína p26 da amostra. Na maioria dos casos, a linha de precipitação da amostra forma uma linha de identidade com o controle positivo. No entanto, amostras com baixa reatividade apresentam problemas para serem lidas e interpretadas. A linha de identidade não se forma em amostras com baixos níveis de anticorpos anti-p26; ao contrário, se observa um deflexão da linha do controle positivo (Figura 7). A interpretação dessas amostras se torna mais difícil podendo produzir resultados conflitantes ou até mesmo falso negativos (Issel et al., 1988; McConnico et al., 2000; Cullinane et al., 2007).

No presente estudo, os leitores da IDGA com o kit A segundo Portaria 84/1992 do MAPA relataram que as linhas de precipitação formadas entre o antígeno, o controle positivo e as amostras eram muito finas e claras, tornando a leitura e interpretação extremamente difíceis (Figura 8). Esse mesmo relato está em um informativo técnico do laboratório IDEXX (2007). Silva et al. (2009) reportaram a dificuldade de visualização das linhas de precipitação formadas no teste IDGA utilizando kits importados submetidos à Portaria 84/1992 do MAPA. Nesse mesmo trabalho, os leitores da IDGA relataram que as linhas de precipitação ao utilizar o kit nacional apresentaram maior nitidez e brilho e que algumas linhas de precipitação utilizando kits importados poderiam não ser visualizadas por técnicos menos experientes, possibilitando leituras negativas falsas.

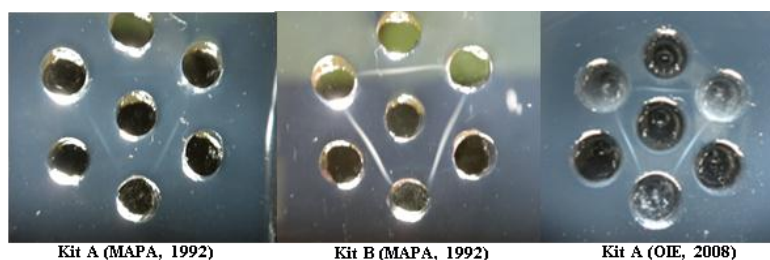


Figura 8: Exemplos de linhas de precipitação da IDGA formadas nos Kits A segundo MAPA e OIE e Kit B segundo MAPA

A diferença de sensibilidade do kit A segundo Portaria 84/1992 do MAPA ficou ainda mais evidente após se realizar a

IDGA utilizando amostras com diferentes graus de positividade em diluição seriada na base 2, iniciando com o soro sem diluir até

Até diluição 1:256, com leituras realizadas após 48h de incubação (Tabela 5).

Tabela 5 - Estimativa do limite de detecção através da leitura de ponto final de reação positiva na IDGA de soros com diferentes graus de positividade

	Ponto final de reações positivas		
	Kit A(MAPA)	Kit A(OIE)	Kit B(MAPA)
Soro ref. Fraco Pos USDA	Sem diluir	1:2	1:4
Pos +1	Sem diluir	1:2	1:4
Pos +2	1:2	1:8	1/8
Pos +3	1:4	1:8	1/8
Pos +4	1:128	1:256	1/256

Para todas as amostras utilizadas, o ponto final de reatividade utilizando o kit A segundo protocolo do MAPA(1992) foi em diluições menores do que para o mesmo kit segundo OIE (2008) e o kit B também segundo protocolo do MAPA. Considerando que o soro positivo +1 desenvolve uma deflexão com o soro padrão na IDGA (Figura 7), pode-se inferir que ele se comportou de maneira semelhante ao soro referência fraco positivo do USDA. Ambos foram positivos com o kit A segundo MAPA (1992) somente quando se utilizou a amostra sem diluir. Entretanto, os mesmos soros foram positivos até diluição 1:2 na IDGA com o kit A segundo OIE (2008) e positivos até diluição 1:4 na IDGA com o kit B segundo MAPA (1992). Issel e Cook (2004) relataram que o soro referência fraco positivo do USDA foi positivo até diluição 1:2 na IDGA enquanto o mesmo soro foi positivo no ELISA até diluição 1:8 em uma comparação entre os dois métodos com kits da *Symbiotics Corporation*. Os kits A e B quando submetidos à IDGA segundo as instruções para os quais foram padronizados apresentaram o mesmo limite de detecção para as amostras positivas +2, +3, e +4.

Vale a pena ressaltar que o soro referência fraco positivo do USDA foi submetido à prova em dias diferentes e com numerações diferentes e, houve falha na interpretação

do resultado em um dia, quando se utilizou a alíquota identificada como 630. Isso pode ter ocorrido devido a real dificuldade de se interpretar a linha de precipitação formada utilizando o kit A em lâmina e com menor quantidade dos reagentes, pois a deflexão da linha do controle positivo se torna mais difícil de ser visualizada. A amostra 633 também foi incluída no experimento como controle positivo, pois ela é proveniente de um muar experimentalmente infectado com o EIAV. Ela foi reportada como negativa na IDGA com o kit A segundo a Portaria 84/1992 do MAPA. As quatro amostras que foram incorretamente classificadas como negativas nesse experimento desenvolveram reações fraco-positivas quando submetidas a IDGA utilizando o kit B nacional segundo protocolo do MAPA (1992) e verdadeiro positivas no ELISA rpg 90 segundo Reis (1997) (Tabela 4). Esse fato ressalta a vulnerabilidade do kit A quando submetido às instruções da Portaria 84/1992 do MAPA na detecção de amostras fraco-positivas, mesmo quando a prova é lida por técnicos treinados e bem familiarizados com a IDGA.

A maior importância da redução da sensibilidade da IDGA se refere ao aumento da possibilidade de se reportar resultados falsos negativos, uma vez que o controle da AIE depende da detecção dos animais infectados através desse teste. Ressaltando que o Brasil possui um rebanho efetivo de

equídeos estimado em mais de 5 milhões de cabeças (IBGE, 2007), os animais não diagnosticados permanecem nos rebanhos como reservatórios da doença ou podem continuar sendo transportados livremente colocando outros animais em risco (McConnico et al., 2000).

Durante as leituras da IDGA, três amostras permaneceram com resultados persistentemente conflitantes entre os leitores da prova com os dois kits (A e B), nos dois diferentes protocolos (Tabela 6). O

procedimento ideal seria solicitar nova coleta de amostras após no mínimo 10 a 14 dias e retestá-las na IDGA, uma vez que os animais podem estar recentemente infectados pelo EIAV e o sistema imunológico ainda não teve tempo suficiente para montar a resposta imune humoral contra o vírus (Issel e Adams, 1982; Issel e Cook, 1993). A legislação brasileira recomenda a nova coleta de amostra 30 e 60 dias após o primeiro teste para confirmação dos resultados conflitantes na IDGA (BRASIL, 2004).

Tabela 6 - Amostras de soro de equídeos que persistiram com resultados conflitantes entre os leitores na IDGA MAPA e OIE (2008) com os Kits A e B

Amostra	IDGA	ELISA	Imunoblot		
			gp90	gp45	p26
432	(+/-)	+	+	+	+
566	(+/-)	Ind	+	+	-
729	(+/-)	-	+	+	-

(+/-) resultados conflitantes entre os leitores com os kits A e B segundo OIE (2008) e Portaria 84/1992 do MAPA

Dessas três amostras, apenas uma teve resultado positivo no ELISA. As outras duas apresentaram resultados indeterminados no ELISA que, de qualquer forma, não é um método utilizado como confirmatório no diagnóstico da AIE. A coleta de nova amostra não foi possível de ser realizada durante o experimento, uma vez que foram utilizadas amostras de soro provenientes de banco de soros. Dessa forma, as mesmas amostras foram submetidas ao imunoblot na tentativa de elucidar essas discordâncias. A amostra que foi positiva no ELISA reagiu com as três principais proteínas virais (gp90, gp45 e p26) no imunoblot, sendo então considerada positiva para AIE. As outras duas tiveram apenas anticorpos reagentes contra as glicoproteínas gp90 e gp45 externas do envelope viral. Isso indica que provavelmente esses animais estavam em fase inicial da doença, pois apresentavam anticorpos contra as glicoproteínas do envelope e não tinham quantidade

suficiente de anticorpos anti-p26 para reagir no imunoblot e na IDGA. A p26 é a proteína mais abundante da partícula viral, porém é um alvo mais tardio da resposta imune do hospedeiro ao EIAV em relação às glicoproteínas do envelope e transmembrana. Já foi demonstrado que os níveis de anticorpos específicos contra a glicoproteína gp90 são cerca de 100 a 1000 vezes mais abundantes do que os anticorpos específicos contra a p26 (Montelaro et al., 1984; Issel et al., 1988; Rwambo et al., 1990).

4.2.3 Avaliação da influência do tempo de incubação nos resultados da IDGA

Muitos trabalhos publicados relatam diversas vantagens da IDGA no diagnóstico da AIE, principalmente em relação a sua alta especificidade, uma vez que um animal positivo neste teste correlaciona-se com a infecção pelo EIAV (Pearson et al., 1971;

Coggins et al., 1972), como também o baixo custo do teste. No manual sobre o teste de IDGA do *National Veterinary Services Laboratories - NVSL* (2008) é recomendado um período de incubação de no mínimo vinte e três horas e meia para se realizar as leituras da prova, e que períodos maiores que 24 h beneficiam a detecção de amostras com reações fracas positivas. No

presente estudo, foi observado que pelo menos uma amostra, de um total de 345 amostras de soro de equídeos (1/345), tornou-se positiva após 48 h de incubação, quando a IDGA foi realizada com os Kits A e B segundo os protocolos preconizados pelo MAPA e pela OIE respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 – Total de amostras positivas e negativas após 24 e 48 h de incubação

Período de incubação	Kit A (MAPA)		Kit A (OIE)		Kit B (MAPA)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
	Total de amostras positivas	96	97	99	100	100
Total de amostras negativas	249	248	246	245	245	244
Total	345	345	345	345	345	345

Dessa forma, acredita-se que o ideal seria sempre recomendar um período de incubação de 48h, para minimizar a possibilidade de liberação de resultados erroneamente negativos, uma vez que se aumenta a possibilidade de formação de linhas de precipitação visíveis entre antígeno e anticorpo em um tempo mais longo de incubação.

Ao realizar a IDGA com o Kit B segundo Portaria 84/1992 do MAPA utilizando 30

amostras de soros conhecidamente positivas para AIE e outras 30 amostras de soro conhecidamente negativas para AIE, com leituras realizadas após 24h, 36h, 48h, 72h e 96h de incubação, uma amostra positiva desenvolveu linha de precipitação visível apenas após 36h de incubação (Tabela 8). As demais amostras desenvolveram os resultados esperados com 24h de incubação e permaneceram com as mesmas leituras até 96h de incubação.

Tabela 8 – Total de amostras positivas e negativas após 24h, 36h, 48h, 72h e 96h de incubação

Período de incubação	Kit B (MAPA)				
	24h	36h	48h	72h	96h
Total de amostras positivas	29	30	30	30	30
Total de amostras negativas	31	30	30	30	30
Total	60	60	60	60	60

Pode-se notar mais uma vez que amostras com reações fracas positivas necessitam de períodos maiores que 24h de incubação para que as linhas de precipitação se formem tornando possíveis as leituras corretas de seus resultados. Também se notou que as linhas de precipitação se tornaram mais visíveis em períodos de

incubação superiores à 36h, permanecendo sem alterações após 48h de incubação.

4.2.4 Avaliação da ocorrência de reações inespecíficas na IDGA

De acordo com a tabela 9, das 345 amostras de soro submetidas à IDGA utilizando o kit

A segundo Portaria 84/1992 do MAPA, três apresentaram linhas que não tinham identidade com o controle positivo, caracterizando a ocorrência de 0,87% de reações inespecíficas. Ao utilizar o kit A, segundo OIE (2008), cinco amostras do total de 345 formaram linhas que não tinham identidade com o controle positivo,

caracterizando a ocorrência de 1,45% de reações inespecíficas. Das 345 amostras de soro submetidas à IDGA utilizando o kit B segundo Portaria 84/1992 do MAPA, doze amostras apresentaram linhas que não tinham identidade com o controle positivo, caracterizando a ocorrência de 3,48% de reações inespecíficas.

Tabela 9 – Ocorrência de reações inespecíficas ou não identidade na IDGA

	Reações inespecíficas	Ocorrência (%)
Kit A (MAPA)	3/345	0,87
Kit A (OIE)	5/345	1,45
Kit B (MAPA)	12/345	3,48

A diferença na ocorrência de reações inespecíficas ao realizar a IDGA com os kits A e B pode ser decorrente de diferenças no processo de purificação do antígeno do EIAV realizado por cada empresa fabricante dos kits de IDGA. Tanto o kit A, importado, quanto o kit B, nacional, utilizam como antígenos proteínas nativas do vírus obtidas a partir da infecção de células de linhagem contínua com o EIAV e não antígenos recombinantes. Com os resultados encontrados, pode-se deduzir que

o kit A apresenta antígeno mais purificado que o kit B. Sabe-se que, atualmente, devido a maior purificação dos reagentes, como também a utilização de antígenos recombinantes, a ocorrência de reações inespecíficas está diminuindo (Issel e Cook, 2004). Durante o presente estudo, os leitores dos testes de IDGA relataram que a ocorrência das reações inespecíficas não prejudicou as leituras dos resultados (Figura 9).

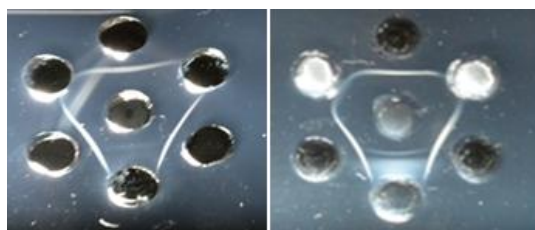


Figura 9: IDGA com linhas de precipitação não identidade com o controle positivo

4.2.5 Avaliação da influência da temperatura na IDGA

Uma das exigências do NVSL (2008), como também do MAPA (1992) é o controle da temperatura interna dos laboratórios credenciados para o diagnóstico da AIE sendo que a IDGA deve ser realizada em ambiente com temperaturas entre 20 e 25°C. Devido a

enorme extensão territorial do Brasil e com a preocupação relacionada a grandes diferenças de clima, foi realizada uma avaliação da influência da temperatura nos resultados da IDGA. De acordo com a tabela 10, as IDGA's realizadas nas temperaturas de 15°C, média de 15, 28°C, com intervalo de confiança de 95%

variando de 13,3 a 17,25°C; na temperatura de 20-25°C, média de 21,09°C com intervalo de confiança de 95% variando de 20,20 a 21,98°C; na temperatura de 30°, média 30,93°C, com intervalo de confiança de 95% variando de 29,64 a 32,2°C; na

temperatura de 37°C média de 37,08°C, com intervalo de confiança variando de 36,7 a 37,45°C apresentaram os resultados esperados das dez amostras positivas e das 10 amostras negativas após 48h de incubação.

Tabela 10 – Influência da temperatura no resultado da IDGA

Temperatura (°C)	Amostras positivas (kit B MAPA)	Amostras negativas (kit B MAPA)
4-8 (4,98)	7	13
15 (15,28)	10	10
20-25 (21,98)	10	10
30 (30,93)	10	10
37 (37,08)	10	10

A IDGA realizada na temperatura de 4-8°C, média de 4,98°C, com intervalo de confiança de 95% variando de 3,93 a 6,03°C (3/10) amostras conhecidamente positivas na IDGA para AIE não formaram linhas de precipitação com o antígeno, após 48h de incubação. Ao nível de significância de 5% identificou-se que a temperatura de 4-8°C influenciou o resultado dos testes.

4.3 IDGA x ELISA

Todos os índices da comparação entre ELISA e IDGA foram calculados baseados no teste de IDGA, apesar desse não ser considerado “teste ouro”, do inglês “*gold standard*”, pois não detecta animais na fase inicial da doença (Soutullo et al., 2001).

Para as comparações entre IDGA e ELISA foram descritas somente com os resultados obtidos na IDGA realizada utilizando o kit B, nacional, segundo as instruções da Portaria 84/1992 do MAPA.

4.3.1 Equídeos

De acordo com os resultados apresentados na tabela 11, referente à comparação dos resultados de 345 amostras de soro de equídeos submetidas à IDGA, realizada segundo Portaria 84/1992 do MAPA utilizando o Kit B e submetidas ao ELISA segundo Reis (1997), oitenta e oito amostras foram positivas e 149 foram negativas nos dois testes. Outras 7 amostras foram positivas na IDGA e negativas no

ELISA e 71 foram negativas na IDGA e positivas no ELISA. As 30 amostras restantes foram indeterminadas no ELISA (seis desenvolveram resultado positivo na IDGA e 24 foram negativas na IDGA). O índice kappa encontrado foi de 0,426 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,335 a 0,517 demonstrando concordância moderada nessa análise, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003). A sensibilidade relativa do ELISA foi de 92,6% (IC de 84,9% a 96,7%).

Tabela 11- Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA rpg90 para amostras de soro de equídeos

IDGA (Kit B - MAPA)	ELISA			Total
	Positivo	Negativo	Indeterminado	
Positivo	88 (VP)	7 (FN)	6	101
Negativo	71 (FP)	149 (VN)	24	244
Total	159	156	30	345
Kappa	0,426	Sensibilidade 92,6%		

VP: verdadeiro positivo VN: verdadeiro negativo FN: falso negativo FP: falso positivo

No presente estudo, tanto a sensibilidade quanto a concordância do ELISA rpg90 em relação à IDGA, foram inferiores às encontradas por Martins (2004) e Santos (2006), sensibilidade de 97,81% e kappa de 0,776, respectivamente. Com o intuito de se investigar melhor esses resultados, foi realizado o estudo da resposta sorológica nos testes diagnósticos separadamente por espécie.

4.3.2 Equinos

De acordo com os resultados apresentados na tabela 12, referente à comparação dos resultados de 106 amostras de soro de equinos submetidas à IDGA, realizada segundo Portaria 84/1992 do MAPA

utilizando o Kit B e submetidas ao ELISA segundo Reis (1997) 37 amostras foram positivas e 52 foram negativas nos dois testes. Uma amostra foi positiva na IDGA e negativa no ELISA e 15 foram negativas na IDGA e positivas no ELISA. Apenas uma amostra foi indeterminada no ELISA e negativa na IDGA. O índice kappa encontrado foi de 0,681 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,546 a 0,817 demonstrando concordância substancial nessa análise, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003). A sensibilidade relativa do ELISA foi de 97,4% (IC de 84,6% a 99,9%).

Tabela 12- Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA rpg90 para amostras de soro de equinos

IDGA (Kit B - MAPA)	ELISA			Total
	Positivo	Negativo	Indeterminado	
Positivo	37 (VP)	1 (FN)	0	38
Negativo	15 (FP)	52 (VN)	1	68
Total	52	53	1	106
Kappa	0,681	Sensibilidade 97,4%		

VP: verdadeiro positivo VN: verdadeiro negativo FN: falso negativo FP: falso positivo

Os valores de kappa e da sensibilidade relativa do ELISA encontrada no presente estudo foram próximos aos valores encontrados no trabalho de Motta (2007) que foram kappa de 0,830 e sensibilidade de 93,42% para os equinos. Uma amostra

positiva na IDGA foi negativa no ELISA. Tal fato pode estar relacionado à possibilidade de reação cruzada com outros retrovírus em relação à IDGA (Langemeier et al., 1996), bem como a possibilidade de existência de uma nova variedade genética

resultante de mutações no gene *env* e, conseqüentemente variação na antigenicidade das proteínas do envelope como a observada no HIV, já que a proteína *rgp90* usada foi baseada na seqüência clonada a partir da amostra “Wyoming” do EIAV. Quinze amostras foram consideradas negativas na IDGA e positivas no ELISA. Estes resultados podem estar relacionados a amostras fracamente positivas que foram consideradas negativas na IDGA e verdadeiramente positivas no ELISA, sendo esta uma característica importante do teste de ELISA, concordando com Soutullo et al. (2001) e Martins (2004). O ELISA utilizado no experimento é para detecção de anticorpos contra a glicoproteína 90 do envelope do EIAV, que são os primeiros a surgirem em animais infectados e em títulos até 1000 vezes maiores do que anticorpos contra a proteína 26 utilizada na IDGA (Montelaro et al., 1984; Issel et al., 1988; Rwambo et al., 1990). Esse fato pode ser a justificativa para os resultados positivos no ELISA dos 13 animais negativos na IDGA.

4.3.3 Muare

De acordo com os resultados apresentados na tabela 13, referente à comparação dos resultados de 105 amostras de soro de muare submetidas à IDGA, realizada segundo Portaria 84/1992 do MAPA utilizando o Kit B e submetidas ao ELISA segundo Reis (1997), 41 amostras foram positivas e 42 foram negativas nos dois testes. Cinco amostras foram positivas na IDGA e negativas no ELISA e sete foram negativas na IDGA e positivas no ELISA. As 10 amostras restantes foram indeterminadas no ELISA (seis foram positivas e quatro foram negativas na IDGA). O índice kappa encontrado foi de 0,617 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,459 a 0,775 demonstrando concordância substancial nessa análise, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003). A sensibilidade relativa do ELISA foi de 89,1% (IC de 75,6% a 95,9%).

Tabela 13- Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA *rgp90* para as amostras de soro de muare

IDGA (Kit B - MAPA)	ELISA			Total
	Positivo	Negativo	Indeterminado	
Positivo	41 (VP)	5 (FN)	6	52
Negativo	7 (FP)	42 (VN)	4	53
Total	48	47	10	105
Kappa	0,617		Sensibilidade	89,1%

VP: verdadeiro positivo VN: verdadeiro negativo FN: falso negativo FP: falso positivo

Os índices encontrados na comparação para muare são superiores àqueles encontrados por Motta (2007). As amostras de soro de muare positivas na IDGA e que foram negativas no ELISA podem ser amostras fracas positivas consideradas erroneamente negativas na IDGA, visto que a subjetividade da leitura da IDGA pode levar a falhas na conclusão dos resultados. Das amostras que desenvolveram resultados

indeterminados no ELISA, seis foram confirmadas como positivas na IDGA e 4 foram negativas. Issel e Cook (2004) defendem que um resultado negativo no ELISA é mais seguro que resultados falsos negativos na IDGA. Eles acreditam que é melhor resolver problemas relacionados a resultados falsos positivos e indeterminados no ELISA do que relatar resultados falsos negativos na IDGA, pois casos em que eles

continuassem se movendo livremente e, esse fato pode ter ajudado na perpetuação do EIAV no passado.

4.3.4 Asininos

De acordo com os resultados apresentados na tabela 14, referente à comparação dos resultados de 122 amostras de soro de asininos submetidas à IDGA, realizada segundo Portaria 84/1992 do MAPA utilizando o Kit B e submetidas ao ELISA segundo Reis (1997) seis amostras foram

positivas e 50 foram negativas nos dois testes. Quarenta e nove amostras foram negativas na IDGA e positivas no ELISA. As 17 amostras restantes foram indeterminadas no ELISA e negativas na IDGA. O índice kappa encontrado foi de 0,080 com intervalo de confiança de 95% variando de -0,002 a 0,163 demonstrando ligeira concordância nessa análise, segundo interpretação de Dohoo et al. (2003). A sensibilidade relativa do ELISA foi de 100% (IC de 51,7 % a 100%).

Tabela 14- Análise de concordância entre IDGA utilizando Kit B (MAPA) e ELISA rpg90 para as amostras de soro de asininos

IDGA (Kit B - MAPA)	ELISA			Total
	Positivo	Negativo	Indeterminado	
Positivo	6 (VP)	0 (FN)	0	6
Negativo	49 (FP)	50 (VN)	17	116
Total	55	50	17	122
Kappa	0,080			Sensibilidade 100%

VP: verdadeiro positivo VN: verdadeiro negativo FN: falso negativo FP: falso positivo

Os índices encontrados na comparação entre ELISA e IDGA para a espécie asinina não foram bons, uma vez que do total de 55 amostras positivas no ELISA apenas 6 puderam ser consideradas verdadeiramente positivas, pois formaram linhas de precipitação na IDGA. As demais 49 amostras de soro foram negativas na IDGA. A alta ocorrência de animais falsos positivos na comparação dos testes sorológicos para amostras de soro provenientes de asininos, fez com que fosse aprofundado os estudos do perfil sorológico desses animais. Foi utilizado o imunoblot, que é uma técnica mais sensível e que auxilia na elucidação das discordâncias entre ELISA e IDGA, como também na determinação da cinética da resposta imune dos animais infectados pelo EIAV. Na espécie asinina, o vírus pode sofrer maior variabilidade antigênica e por isso, testes

com antígenos de vírus estrangeiros, podem diminuir a habilidade da IDGA de detectar amostras de soros positivas provenientes de animais brasileiros, apesar da p26 ser considerada uma proteína conservada do EIAV. Não há disponível no mercado kits de diagnóstico que utilizam proteínas provenientes de cepa brasileira do EIAV. De acordo com a tabela 15, referente à avaliação dos resultados conflitantes entre ELISA rpg90 e IDGA de 35 amostras de asininos, a partir de um total de 66 amostras, dezessete amostras não apresentaram reatividade com nenhuma proteína do EIAV no imunoblot. Segundo Issel e Cook (2004) as amostras que são repetidamente positivas no ELISA e negativas na IDGA e que não reagem com nenhuma proteína no teste de imunoblot são consideradas falso positivas.

Tabela 15- Amostras de soro de asininos submetidas ao Imunoblot para confirmação dos resultados discordantes entre IDGA e ELISA

Amostra	IDGA	ELISA	Imunoblot		
			gp90	gp45	p26
494	-	Ind	-	-	-
497	-	Ind	-	-	-
507	-	Pos	-	-	-
508	-	Pos	-	-	-
509	-	Pos	-	-	-
515	-	Ind	-	-	-
523	-	Pos	-	-	-
524	-	Pos	-	-	-
527	-	Pos	-	-	-
528	-	Pos	-	-	-
530	-	Pos	-	-	-
532	-	Pos	-	-	-
535	-	Pos	-	-	-
539	-	Pos	-	-	-
540	-	Pos	-	-	-
555	-	Pos	-	-	-
556	-	Pos	-	-	-
487	-	Ind	+	-	-
488	-	Ind	+	-	-
496	-	Ind	+	-	-
498	-	Ind	+	-	-
503	-	Ind	+	-	-
518	-	Pos	+	-	-
520	-	Pos	+	-	-
522	-	Pos	+	-	-
525	-	Pos	+	-	-
529	-	Pos	+	-	-
534	-	Pos	+	-	-
538	-	Pos	+	-	-
541	-	Pos	+	-	-
493	-	Ind	+	-	+
516	-	Pos	+	-	+
531	-	Pos	+	-	+
533	-	Pos	+	-	+
521	-	Pos	+	+	+

1. Imunodifusão em Gel de Ágar segundo Portaria 84/1992 do MAPA e OIE (2008)

Outras treze amostras apresentaram anticorpos reagentes somente contra a gp90 do envelope do EIAV, sendo dessa forma, consideradas negativas para AIE. Como foi utilizado um ELISA baseado na identificação de anticorpos anti-gp90, esses animais desenvolveram resultados positivos no ELISA e negativos na IDGA que detecta anticorpos anti-p26. Quando apenas uma

proteína viral é reconhecida pelos anticorpos presentes na amostra de soro do animal no teste de imunoblot, o resultado deve ser reportado como negativo. No entanto, para esses 11 asininos que tiveram anticorpos reagentes contra a gp 90 no imunoblot, acredita-se que esses animais podem estar na fase inicial da infecção pelo EIAV uma vez que, conforme mencionado

anteriormente, esses são os primeiros anticorpos a surgirem em animais infectados e em níveis até 1000 vezes maiores do que anticorpos contra a proteína 26 utilizada na IDGA (Montelaro et al., 1984; Issel et al., 1988; Rwambo et al., 1990).

Motta (2007) encontrou 12 amostras de soro de asininos positivas no ELISA sendo que sete foram também positivas na nested-PCR e negativas na IDGA. Cook et al. (2001) fez uma infecção experimental de quatro pôneis e dois asininos com duas cepas virulentas do EIAV. Os dois asininos apresentaram anticorpos reagentes contra as três principais proteínas virais (gp90, gp45 e p26) no imunoblot após 28 dias de infecção, porém com menor intensidade contra a glicoproteína transmembrana gp45 em relação aos pôneis.

Das cinco amostras restantes, quatro apresentaram anticorpos contra a gp90 e p26 simultaneamente e uma apresentou anticorpos anti-gp90, gp45 e p26 também simultaneamente, sendo, dessa forma, consideradas positivas para AIE. A técnica de imunoblot é mais sensível para a detecção de anticorpos contra o EIAV do que a IDGA, uma vez que para a formação de linhas de precipitação visíveis no gel de ágar é necessário que a amostra de soro proveniente de equídeo infectado contenha uma grande concentração de anticorpos anti-p26. Esses cinco animais podem estar com níveis de anticorpos circulantes muito baixos uma vez que os asininos apresentam níveis de anticorpos, vírus e ácidos nucleicos no plasma inferiores aos equinos conforme relatado por Cook et al. (2001). Devido a essas características, Motta (2007) sugeriu em seu trabalho a necessidade de se utilizar ou até mesmo desenvolver testes mais sensíveis para o diagnóstico da AIE na espécie asinina.

As amostras de soro de asininos que foram utilizadas no presente estudo são

provenientes de animais livres em um município da Região Nordeste do Brasil, onde o rebanho dessa espécie é muito grande. Não há estudos sobre quais as cepas do EIAV estão circulantes no Brasil. Sabe-se que sob condições experimentais, utilizando animais inoculados com cepas conhecidas do EIAV, a resposta imune do animal ocorre dentro de 45 dias (Issel e Cook, 1993). Para se verificar diferenças em animais de campo expostos ao EIAV, recomenda-se retestar esses animais 30 e 60 dias após a primeira coleta de sangue (BRASIL, 2004). No presente trabalho, isso não foi possível de realizar, devido à dificuldade de se encontrar os mesmos animais para a realização de nova coleta de amostras de soro.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir:

- Apesar de boa concordância entre os kits de IDGA importado (kit A) e nacional (kit B), o kit A, segundo o protocolo do MAPA, falhou na detecção de anticorpos em 1,16% de amostras.
- Através da estimativa de limite de detecção, pode-se verificar a menor sensibilidade analítica do kit A, importado, realizado segundo protocolo do MAPA.
- A partir dos dados relativos ao tempo de incubação da IDGA apresentados recomenda-se o período de incubação de 48h para evitar liberação de resultados falsos negativos.
- Temperaturas baixas de incubação da IDGA (4-8°C) influenciam nas leituras de forma negativa com perda de sensibilidade.
-

- O ELISA rpg 90 pode ser usado como método de triagem para equinos e muaras devido à boa concordância encontrada entre este método e a IDGA para ambas espécies.
- A ligeira concordância encontrada entre ELISA rpg90 e IDGA para os asininos demonstrou que para o estudo de AIE nessa espécie é necessário o uso de técnicas de diagnóstico mais sensíveis, como por exemplo, o imunoblot.

Perspectivas após a execução desse trabalho:

- Realização de estudos mais aprofundados da cinética da resposta imune ao EIAV pelos asininos como também aprofundar nos estudos do comportamento viral e avaliação de sinais clínicos nessa espécie durante a infecção.
- Necessidade de se desenvolver ou adotar algum método diagnóstico mais sensível para o diagnóstico da AIE na espécie asinina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. M. A.; GONCALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo.*, v. 58, n. 02, p. 141-148, 2006.

ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; VISSANI, A. et al. Standardization and validation of an Agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Vet. Microbiol.*, v.121, p.344-351, 2007.

BATISTA JÚNIOR, J. A.; FONSECA, V. O. Anemia Infecciosa Equina. *Arq. Esc. Vet.*, v.23, p.281-290,1971.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 45, de 15 de junho de 2004. Aprova as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa Equina – AIE. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária*, Brasília, DF 07 jul. 2004. Seção 1, p. 7-9.

BURKI, F.; ROSSMANITH, E. Comparative evaluation of the Agar Gel Immunodiffusion Test and Two Commercial ELISA kits for the Serodiagnosis of Equine Infectious Anemia. *J. Vet. Med.*, v.37, p.448-458, 1990.

BURKI, F.; ROSSMANITH, W.; ROSSMANITH, E. Equine Lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.*, v.33, p.353-360, 1992.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet*, n.60, p.330, 1970.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L.; NUSBAUM, R. Diagnosis of Equine Infectious Anemia by Immunodiffusion Test. *Am.J.Vet.Res.* n.1, v.33, p.11-17, 1972.

COOK, S.J., COOK, R.F.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet. Microbiol.*, v.79, n.2, p.93-109, 2001.

COOK, R.F.; COOK, S.J.; Li, F. et al. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol Meth.*, v.105, p.171-179, 2002.

COOK, R. F., COOK, S. J., BOLIN, P. S., et al. Genetic immunization with codon-optimized equine infectious anemia virus (EIAV) surface unit (SU) envelope sequences stimulate immune responses in ponies. *Vet. Microbiol.*, v.108, p.23-37, 2005.

COOK, R.F.; COOK S.J. and ISSEL, C.J. Infectious diseases of the horse: Equine Infectious Anaemia. In. MAIR, T.S. and HUTCHINSON R.E. *Eq. Vet. J. Cambridgeshire*, p. 56-70, 2009.

CRAIGO, J.K.; MONTELARO, R.C. Equine Infectious Anemia Virus. *Encyclop. of Virol.*, 2.ed., vol.2, p.167-174, 2008.

CULLINANE, A.; QUINLIVAN, M.; NELLY, M. et al. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Vet. Rec.*v.161, p. 647-652, 2007.

DOHOO, I.R.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Vet. Epidemiol. Res.* Segunda edição, Cap.5, p.92-127. Charlottetown: AVC Inc., 2003.

DUPONT, O.; DACORSO FILHO, P.; MUCHALUAT, M.A. et al. Diagnóstico da anemia infecciosa Equina no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1, 1968,

Niterói. Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.160-161.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agropecuário 2006. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação, p.320-322. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf Acesso em: 23 de Maio 2011

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009> Acesso em: 15 de Maio 2011

IDEXX LABORATORIES. Comparison study using three different Agar Gel Immunodiffusion Tests (AGID) for Equine Infectious Anemia (EIA). Disponível em: <<http://www.beatus.co.th/pictures/EIAequine.pdf>> Acesso em: 15 de Maio. 2011.

ISSEL, C. J., COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.174, n.7, p. 727-733, 1979.

ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V. Detection of Equine Infectious Anemia Virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.180, n.3, p.276-278, 1982.

ISSEL, C. J.; RWAMBO, P. M.; FOIL, L. D.; et al. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector

- transmission and genetic analysis. *Vet. Microbiol.*, v.17, p.251, 1988.
- ISSEL, C. J.; COOK, R.F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diag. Invest.* v.5, p. 137-141, 1993.
- ISSEL, C.J.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; et al. Optimal paradigms for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Eq. Vet. Sci.*, n.19, v.11, p.728-732, 1999.
- ISSEL, C. J. & COOK, S. J. Equine infectious anaemia and control of the disease: How much is enough? Report of the United States Animal Health Association Committee on Infectious Diseases of Horses. pp 316-327, 2004. Disponível em: www.usaha.org/committees/reports/2004/report-hd-2004. Acesso em: Abril de 2011.
- ISSEL, C. J. Equine Infectious Anemia Program Website. University of Kentucky, Lexington, Kentucky. 2009. Disponível em: <http://dept.ca.uky.edu/eia/index.aspx> Acesso em: Maio de 2011.
- KONO U.; KOBAYASHI, K. Complement fixation of equine infectious anemia. Specificity of the test. *Nat. Inst. Anim. Health.*, v. 6, p.194–203, 1966.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKANAGA, Y. Serological comparison among various strains of equine infectious anemia virus. *Arch. Gesame Virusforsch.* V.41, p.1-10, 1973.
- KONO Y.; KOBAYASHI, K.; FUKANAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, v. 41, p.1–10, 1973.
- LEROUX, C.; CADORÉ, J.L.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus (EIAV): What has HIV's country cousin got to tell us? *Vet.Res.*, v.35, p.1-19, 2004.
- LEW, A.M.; THOMAS, L.M.; HUNTINGTON, P.J. A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anaemia virus. *Vet. Microbiol.*, v.34, p.1-5, 1993.
- LICHTENSTEIN, D.L.; RUSHLOW, K.E.; COOK, R.F. et al. Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. *J. Virol.*, v.69, p.2881-2888, 1995.
- MACIEL, A.B. *Infecção Experimental de Equinos (Equus caballus) e Muare (Equusasinus x Equus caballus) com o Vírus da Anemia Infeciosa Equina*. 2008.59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- McCONNICO, R.S.; ISSEL, C.J.; COOK, S.J. et al. Predictive methods to define infection with equine infectious anemia virus in foals out of reactor mares. *J. of Eq.Vet. Sci.*, v.20, n.6, p.387-392, 2000.
- MALQUIST W.A., BARNETT D., BECVAR C.S., Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line, *Arch. Ges. Vir.* 42 (1973) 361-370.

MARTINS, M.F. *Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (gp90) no diagnóstico da anemia infecciosa Equina*. 2004.59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n. 84 de 1992. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/act ion/detalhaAto.do?method=consultarLegisl acaoFederal> Acesso em: Setembro, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n. 495 de 2010. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/act ion/detalhaAto.do?method=consultarLegisl acaoFederal> Acesso em: Setembro, 2011.

MONTELARO, R.C.; PAREKH, B.; ORREGO, A. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus, *J. Biol. Chem.*, v.259, p.10539–10544, 1984.

MONTELARO, R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K.E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.). *The retroviridae*. New York: Plenum Press, 1993. v.2, Cap.5, p.257-359.

MOTTA, P.M.C. *Comparação da IDGA, ELISA e “nested” PCR no diagnóstico da anemia infecciosa Equina em equinos, asininos e muares*. 2007. 29f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NAKAJIMA, H.; USHIMI, C. Immunodiffusion Studies of Purified Equine

Infectious Anemia Virus. *Infec. Imm American Society of Microbioly.*, v.3, nº3, p. 373-377, 1970.

NAKAJIMA, H.; USHIMI, C.; FUKUNAGA, Y. et al. Preparation of Equine Infectious Anemia Virus Antigen for Immunodiffusion Test. *Archiv.fur die ges. Virusfor.*, v.42, p.339-345, 1973.

NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES. Agar Gel Immunodiffusion (Coggins) Test for Equine Infectious Anemia. Document Number. SOP-EO-0101.02. p.1-17. 2008.

NOGUEIRA, M.F.; NETO, A.A.C.; JULIANO, R.S. et al. ELISA rgp90 – Metodologia Alternativa para o Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina no Pantanal. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. EMBRAPA, v.93, p.1-19, 2009.

PARÉ, J.; SIMARD, C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *The Canad. J.of Vet. Res.* v.68, p.254-258, 2003.

PEARSON, J.E., BECVAR, C.S. and MOTT, L.O. Evaluation of the immunodiffusions test for the diagnosis of equine infectious anemia. *Proc. US anim. Health Ass.* v.74, p.259-267, 1971.

PIZA, A.S.T.; PEREIRA, A.R.; TERRERAN, M.T. et. al, Serodiagnosis of equine anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in Escherichia coli as antigen, *Prevent. Vet. Med.*, v.78, p. 239-245, 2007.

QUINLIVAN, M.; COOK, R.F.; CULLINANE, A. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *Vet Rec.*, v.160, n.18, p.611-618, 2007.

REIS, J.K. P. *Produção de antígenos recombinantes gp90- e p26 do vírus da Anemia Infeciosa Equina para uso em imunodiagnóstico*, 1997. 184f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ROSSMANITH, W.; HORVATH, E. Ein Western Blot test zur serologischen diagnose der Infekti sen Anamie der Pferde. *J. Vet. Med*, B36, p.49-56, 1989.

RWAMBO, P.M.; ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V. et al. Equine Infectious Anemia Virus: humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection. *Arch. Virol.*, v.111, p.199-212, 1990.

SANTOS, E.M. *Avaliação da PCR (Polymerase Chain Reaction) para Diagnóstico da Anemia Infeciosa Equina*. 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SELLON, D.C. Equine infectious anemia. *Vet. Clin. N. Am. Equine Practice.*, v.9, n.2, p.321-336, 1993.

SHANE, B.S.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of

equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. of Clin.l Microbiol.*, v.19, n.3, p.351-355, 1984.

SHEN, D.T.; GOHHAM.J.R.; MC GUIRE, T.C. Enzyme –linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia antibody to purified p26 viral protein Am. *J. Vet. Res.*, v.45, p. 1542-1543, 1984.

SILVA, R.A.; SILVA, N.M.; FREITAS, W.M. et al. Ocorrência da anemia infecciosa no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968. Anais. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.173-182

SILVA, A.R.S.; REIS, J.K.P.; LEITE, R.C. et al. Visibilidade de linhas de precipitacao obtidas com sistemas comerciais de diagnostico da anemia infecciosa equina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 31, p. 125-128, 2009.

SOUTULLO, A.; VERWIMP.; RIVEROS, M.; PAULI, R. et al. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet. Microbiol.*, n.79, p.111-121, 2001.

SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V. et al. Equine infectous anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Vet. Microbiol.*, v.95, p.49-59, 2003.

SUZUKI, T.; UEDA, S.; SAEJIMA, T. Enzyme-linked immunosorbent assay for

diagnosis of equine infectious anemia. *Vet. Microbiol.*, v.7, p. 307-315, 1982.

TOMA, B. Réponse sérologique négative persistante chez une jument infectée par le virus de l'anémie infectieuse des équidés. *Rec. Méd. vét.*, v.156(1). p.55-63, 1980.

UEDA, S.; SAMEJIMA, T6.; KURODA, S. et al. Preparation of Equine Infectious Anemia antigens for Diagnosis. *Jap. Jour. Microbiol.* v.17, n.5, p.393-399, 1973.

USHIMI, C.; NAKAJIMA, H.; TANAKA, S. Demonstration of equine infectious anemia viral antigen by

immunofluorescence. *Nat. Inst. Anim. Health.*, v.10, p.90-91, 1970.

VALLÉ, H.; CARRÉ, H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, v.139, p.1239, 1904.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Equine Infectious Anaemia In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Paris: OIE, 2008. Vol.2. Chapter 2.5.6, 866-870. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.06_EIA.pdf Acesso em: Maio de 2011.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado CETEA 131/2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 131/2010, relativo ao projeto intitulado "*Avaliação da sensibilidade da técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) no diagnóstico da anemia infecciosa equina*", que tem como responsável(is) Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de 11/ 08/2010.

Este certificado expira-se em 11/ 08/ 2015.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 131/2010, related to the project entitled "*Evaluation of agar gel immunodiffusion (AGID) sensibility in diagnosis of equine infectious anemia*", under the supervisors of Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in August 11, 2010.

This certificate expires in August 11, 2015.

Belo Horizonte, 13 de Agosto de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2^o Andar, Sala 2005
31276-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@arq.ufmg.br

ANEXO 2 – Portaria 84/1992 do MAPA

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA

PORTARIA Nº 84, DE 19 DE OUTUBRO DE 1992.

O SECRETÁRIO NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 78, inciso VII do Regimento Interno da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, aprovado pela Portaria Ministerial nº 212 de 21 de agosto de 1992, resolve:

Art. 1º. Aprovar as "Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Anemia Infecciosa Equina" em anexo.

Art. 2º. Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se as disposições em contrário.

JOSÉ PEDRO GONZALES

ANEXO

NORMAS PARA CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

Para efeito de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina, serão obedecidas as determinações constantes das Portarias nº 53 da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (SNAD) de 20 de maio de 1991 e nº 1 da Divisão de Laboratório Animal (DLA) de 14 de agosto de 1991.

1. MATERIAL:

1.1. Antígeno e soro padrão:

1.1.1. Só poderão ser utilizados antígenos (Ag) e o soro controle positivo (SCP) registrados na Coordenação de Produtos Veterinários - Departamento de Defesa Animal, observado o prazo de validade.

1.1.2. O Ag e o SCP devem ser, dependendo da demanda dos testes, divididos em frações menores, identificadas e estocadas a - 20oC.

1.2. Amostra a ser testada : Soro sanguíneo

2. RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS:

2.1. As amostras deverão estar devidamente identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas.

2.2. As amostras deverão estar acompanhadas de requisição de exame assinada por médico veterinário com sua identificação profissional (modelo Portaria 77).

2.3. Não serão recebidas amostras com evidência de contaminação.

2.4. As amostras serão registradas em livro próprio, conforme modelo indicado pela CLA.(Anexo V).

2.5. As amostras serão obrigatoriamente divididas em duas alíquotas de 2ml e identificadas, uma para prova e outra para contra-prova na presença do Médico Veterinário requisitante ou seu portador nomeado.

2.6. A declaração de contra-prova (Anexo II) será preenchida e assinada pelo Médico Veterinário requisitante ou seu portador nomeado.

2.7. A tarjeta de identificação da contra-prova (Anexo IV) será preenchida e lacrada juntamente com as amostras para contra-prova; o lacre será plástico, numerado e inviolável.

2.8. No caso de recebimento de sangue, o mesmo deverá ser centrifugado, e o soro receberá o tratamento dos itens anteriores.

3. NOMEAÇÃO DE PORTADOR:

O Médico Veterinário requisitante, caso não seja portador do material coletado, deve nomear um portador conforme modelo indicado pela CGLA (Anexo III).

4. CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM:

4.1. A amostra a ser testada deverá ser conservada sob refrigeração até a realização da prova e destruída após a realização do exame.

4.2. As amostras destinadas a contra-prova deverão ser estocadas em congelador a -20°C, devendo ser mantidas estocadas durante um período de 30 dias após a realização dos exames.

5. SEGURANÇA BIOLÓGICA:

5.1. Deverão ser respeitadas as normas de segurança biológica em todos os procedimentos realizados com o material de exame. 5.2. As amostras destinadas à prova e contra-prova, serão destruídas após decorrido o prazo estabelecido para sua estocagem, obrigatoriamente através de autoclavação a 120°C, com uma libra de pressão durante 30 minutos.

6. MÉTODOS:

6.1. O teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para o diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina (AIE), conforme descrito no Anexo I, é o teste indicado pela Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o diagnóstico desta enfermidade. *(Redação dada pelo(a) Portaria 495/2010/SDA/MAPA)*

Redação(ões) Anterior(es)

6.2. No caso de utilização de kits importados deverá ser seguida a instrução do protocolo constante da bula do distribuidor. *(Acréscitado(a) pelo(a) Portaria 495/2010/SDA/MAPA)*

7. RESULTADOS E RELATÓRIOS:

7.1. Os resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios, segundo modelo estabelecido pela CLA e de acordo com o fluxograma determinado:

7.1.1. Resultado POSITIVO: Imediata e obrigatoriamente comunicado ao Serviço de Defesa Sanitária Animal (SSA) Diretoria Federal de Agricultura e Reforma Agrária (DFARA) da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente. Outro procedimento poderá ser adotado por instrução da DFARA.

7.1.2. Resultado NEGATIVO: Será comunicado ao Médico Veterinário que assinou o pedido de exames e/ou ao interessado.

7.1.3. Todo laboratório credenciado deverá encaminhar até o quinto dia útil do mês subsequente, relatórios das atividades mensais, em formulários próprios (Anexo VI e Anexo III da portaria SNAD no 77 de 28/09/92, publicada no D.O.U. em 13/10/92) a DFARA e ao laboratório da CGLA responsável pela Coordenação da Unidade Federativa onde se localiza o laboratório credenciado.

8. REALIZAÇÃO DOS EXAMES NA CONTRA-PROVA:

- 8.1. A realização de contra-prova somente será efetuada no laboratório realizador do exame.
- 8.2. A solicitação deverá obedecer ao prazo máximo de 8 dias a contar da data do recebimento do resultado.
- 8.3. A contra-prova será solicitada ao Serviço de Sanidade Animal / DFARA da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente. Este a encaminhará ao laboratório realizador do exame.
- 8.4. O Médico Veterinário requisitante do exame obriga-se a pessoalmente, ou por seu representante, a acompanhar, assistido ou não por técnicos de sua confiança, aos exames que serão realizados na contra-prova.
- 8.5. Cabe ao técnico indicado pelo Médico Veterinário requisitante do exame apenas assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado dos exames.
- 8.6. É obrigatória a comunicação ao Serviço de Defesa Sanitária Animal / DFARA, da data e horário da realização do exame da contra-prova, podendo o técnico daquele Serviço assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado.
- 8.7. A ausência do representante do Serviço de Defesa Sanitária Animal / DFARA não constitui óbice para a realização do mesmo, desde que tenha sido observado o disposto no item 8.6.
- 8.8. Após a realização do exame, será lavrada uma ata assinada pelos interessados presentes, onde constará o resultado desse exame e a descrição de todo método analítico nele utilizado.
- 8.9. A desistência do Médico Veterinário requisitante do exame, ou seu representante, mediante declaração escrita, ou a sua ausência na realização do exame da contraprova, importará no preavalecimento do resultado obtido no primeiro exame.

9. DO LABORATÓRIO:

- 9.1. O laboratório deve possuir instalações e equipamentos adequados para a realização da prova de imunodifusão em Gel de Agar e responsável técnico e substituto deste, devidamente habilitado pela CGLA para a realização da prova para diagnóstico de AIE.
- 9.2. As instalações devem fazer parte da mesma base física do laboratório e atender as normas de segurança biológica.
- 9.3. Somente poderá assinar o formulário de resultado do exame e o Relatório Mensal, o responsável técnico ou seu substituto.

10. INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS:

10.1. Instalações:

10.1.1. Protocolo:

Sala destinada ao recebimento das amostras, registro, expedição dos resultados e arquivos dos mesmos. Não requer instalações especiais.

10.1.2. Sala de exame:

Neste local as amostras serão processadas, incluindo-se a identificação, a centrifugação, a divisão em amostras de exames e contra-prova e a realização das etapas do exame propriamente dito. Deverá estar provido de bancada, fontes de eletricidade e gás, persianas ou cortinas (para diminuir a intensidade da luz) e paredes com superfície lavável.

10.1.3.Esterilização e Lavagem:

Deverá estar provido de fonte de alimentação elétrica, de água e de gás, tanques ou pias que permitam a esterilização e a lavagem de todo material utilizado na realização da prova de diagnóstico. As paredes devem estar revestidas por superfície lavável.

10.2. Equipamentos:

10.2.1.Protocolo:

- Arquivo com chave
- Máquina de escrever

10.2.2.Sala de exame:

- Balança analítica ou semi analítica;
- Banho-maria;
- Cuba com água sanitária;
- Câmara úmida;
- Iluminador com fundo preto, para leitura das lâminas;
- Pipetas automáticas de 25 microlitros;
- Bico de Bunsen;
- Vidraria;
- Cortador padrão;
- Geladeira;
- Freezer a -20°;
- Centrífuga clínica;
- pH de teste;

10.2.3.Lavagem e Esterilização:

- Autoclave
- Depósito para água sanitária
- Destilador de água

11. DO RESPONSÁVEL TÉCNICO E SUBSTITUTO

Para efeito de credenciamento e monitoramento, o responsável técnico e seu substituto serão submetidos a exames teóricos e / ou práticos em um laboratório especialmente designado pela CGLA para esta finalidade.

11.1. Prático:

11.1.1.Preparo de material de trabalho compreendendo:

- Tampão

- Gel

11.1.2. Realização do teste :

- Distribuição do gel na lâmina

- Corte do gel com furador

- Distribuição dos reagentes e / ou;

- Leitura de 36 reações com amostras desconhecidas dos candidatos.

11.1.3. Para efeito de monitoramento poderão ser realizados exames a distância, com a efetivação das provas com 36 soros que serão entregues ou enviados ao laboratório. A resposta deverá ser encaminhada ao laboratório da CGLA, responsável pela coordenação da Unidade Federativa onde se localiza o laboratório, em um máximo de 120 horas após o recebimento do teste, em envelope lacrado, com AVISO DE POSTAGEM E RECEBIMENTO (AR).

11.1.4. Para efeito de credenciamento e monitoramento o índice para aprovação no exame prático é de 100% de acerto .

11.2. Teórico:

Entrevista e / ou prova escrita sobre assuntos ligados à etiologia, patogenia, patologia e provas diagnósticas da AIE.

ANEXO I

TÉCNICA DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR PARA DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

A técnica baseia-se na migração radial dupla de antígeno (Ag) e anticorpo (Ac), através do gel de ágar. O encontro dos reagentes, em proporções ótimas, leva à formação de complexos Ag-Ac, insolúveis que precipitam, tornando-se visíveis sob a forma de uma linha ou banda de precipitação. Uma extrema variação na concentração de Ag e Ac pode alterar a localização ou inibir a formação da mesma. Esta reação pode ser, ainda, influenciada por uma variedade de condições físico químicas, dentre elas, concentração eletrolítica, tampão, pH e temperatura. Alterações bruscas de temperatura, durante a incubação, levam a formação de artefatos de técnicas indejáveis para o teste. Altos níveis de lipídeos e proteínas nos reagentes podem afetar a formação e observação da linha de precipitação.

1. MEIOS E SOLUÇÕES:

1.1. Gel à 1%

- Ágar Noble ou agarose 1g

- Tampão borato 100ml Aquecer em banho-maria ou vapor fluente até a completa fusão do ágar.

1.2. Tampão borato :

- NaOH 2g

- H₃BO₃ 9g

- Água destilada q.s.p 1.000 ml OBSERVAÇÕES: As substâncias a serem utilizadas na preparação das soluções deverão ser padrão pró análise (p.a.) .

- O tampão borato deverá ter seu pH entre 8,5 e 8,7.

- O gel deverá ser dividido em alíquotas de acordo com a demanda do laboratório.

- Não devem ser efetuadas sucessivas fusões do gel, desprezando-se o volume não utilizado.

2. PREPARO DE LÂMINAS:

Em lâminas para microscópio, medindo 25 x 75mm, colocar 4,5ml do gel. Após solidificação do gel, fazer os furos com o cortador padrão, com 7 furos, medindo 4mm de diâmetro e 3mm de distância entre os mesmos.

OBSERVAÇÕES: As lâminas não utilizadas devem ser desprezadas. Se houver presença de umidade nas cavidades, as lâminas não deverão ser utilizadas até a sua evaporação.

3. REALIZAÇÃO DA PROVA:

3.1. Distribuição dos reagentes:

3.1.1.Soro a ser testado: Colocar nas cavidades laterais, alternadamente 25 microlitros dos soros a serem testados.

3.1.2.Soro padrão: Colocar nas cavidades laterais, alternadamente 25 microlitros do soro controle positivo.

3.1.3.Antígeno: Colocar na cavidade central 25 microlitros de antígeno padrão.

3.2.Incubação: As lâminas devem ser incubadas, em câmara úmida, em temperatura entre 20° e 25°C, durante 48 horas .

3.3.Leitura: Deverão ser feitas leituras diárias, usando-se uma fonte de luz de intensidade variável com feixe estreito, contra um fundo preto.

4. INTERPRETAÇÃO DA PROVA:

O tipo de reação varia com a concentração da amostra testada . A linha formada com SCP é a base para a leitura do teste . Se ela não estiver nítida o teste não é válido e deve ser repetido.

4.1.NEGATIVA: As linhas formadas entre o Ag e o SCP se dirigem para a cavidade onde se encontram as amostras testadas (Fig. 1).

4.2.Positiva: As linhas formadas entre o Ag e o SCP se fundem com aquelas formadas pelas amostras testadas e formam uma linha contínua de identidade total (Fig.2).

4.3.FRACA POSITIVA: A linha de precipitação de uma amostra fraca positiva tende a se formar mais próximo à cavidade onde se encontra a amostra que está sendo testada. Em casos de títulos baixos de Ac pode-se visualizar somente uma convergência das duas linhas do controle, na direção da cavidade, onde se encontra o soro que está sendo testado (Fig. 3) .

4.4.FORTE POSITIVA: A linha de precipitação de uma amostra com título alto de Ac apresenta-se como uma faixa difusa, entre as duas linhas de controle. Em casos extremos, pode haver a inibição da formação desta faixa e só serão visualizadas as duas linhas de controle, interrompidas, a mesma distância do soro testado, não se verificando nenhuma precipitação entre estas linhas. As amostras que apresentaram reações forte positiva devem ser diluídas em tampão borato e retestadas nas diluições, 1/4 e 1/8 (Fig. 4).

4.5. LINHAS INESPECÍFICAS: A reação inespecífica não forma uma linha contínua com as do controle. Elas são formadas por outras reações Ag-Ac que não aquela específica para AIE.

Uma amostra pode produzir uma reação específica de AIE (positiva) e uma linha de precipitação inespecífica (Fig. 5).

ANEXO II

ANEXO III

ANEXO IV

ANEXO V

D.O.U., 22/10/1992

ANEXO 3 – OIE Terrestrial Manual 2008 – Chapter 2.5.6 Equine Infectious Anaemia

CHAPTER 2.5.6.

EQUINE INFECTIOUS ANAEMIA

SUMMARY

Equine infectious anaemia (EIA) is a persistent viral infection of equids. The causative agent, EIA virus (EIAV) is a lentivirus in the family Retroviridae, sSubfamily Orthoretrovirinae. Other members of the lentivirus genus include: bovine immunodeficiency virus; caprine arthritis encephalitis virus; feline immunodeficiency virus; human immunodeficiency virus 1; human immunodeficiency virus 2; and maedi/visna virus. EIA can be diagnosed on the basis of clinical signs, pathological lesions, serology and molecular methods. Infected horses remain viraemic carriers for life and, with very rare exceptions, yield a positive serological test result. Antibody response usually persists and antibody-positive animals, older than 6–8 months, are identified as virus carriers (below 6–8 months of age, serological reactions can be due to maternal antibodies; status can be confirmed by molecular techniques). Infected equids are potential virus reservoirs. Biting flies are mechanical vectors for the virus in nature.

Identification of the agent: *Virus from a horse can be isolated by inoculating suspect blood into a susceptible horse or on to leukocyte cultures prepared from susceptible horses. Recognition of infection in horses that have been inoculated experimentally may be made on the basis of clinical signs, haematological changes and a positive antibody response determined by an immunodiffusion test or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or by molecular techniques. Successful virus isolation in horse leukocyte cultures is confirmed by the detection of specific EIA antigen, by immunofluorescence assay, polymerase chain reaction, reverse-transcriptase assay, or by the inoculation of culture fluids into susceptible horses. Virus isolation is rarely attempted because of the time, difficulty and expense involved.*

Serological tests: *Agar gel immunodiffusion (AGID) tests and ELISAs are simple, reliable tests for the demonstration of EIAV infection. When ELISAs are positive they should be confirmed using the AGID test. EIA antigens can be prepared from infected tissue cultures or by using recombinant DNA technology.*

Requirements for vaccines and diagnostic biologicals: *There are no biological products currently available.*

A. INTRODUCTION

Equine infectious anaemia (EIA) occurs world-wide. The infection, formerly known as swamp fever, is limited to equids. The disease is characterised by recurrent febrile episodes, thrombocytopenia, anaemia, rapid loss of weight and oedema of the lower parts of the body. If death does not result from one of the acute clinical attacks, a chronic stage develops and the infection tends to become inapparent. The incubation period is normally 1–3 weeks, but may be as long as 3 months. In acute cases, lymph nodes, spleen and liver are hyperaemic and enlarged. Histologically these organs are infiltrated with nests of immature lymphocytes and plasma cells. Kupffer cells in the liver often contain haemosiderin or erythrocytes. The enlarged spleen may be felt on rectal examination. Differential diagnoses include equine viral arteritis (Chapter 2.5.10), and other causes of oedema, fever, or anaemia.

Once a horse is infected with EIA virus (EIAV), its blood remains infectious for the remainder of its life. This means that the horse is a viraemic carrier and can potentially transmit the infection to other horses (4). Transmission occurs by transfer of blood from an infected horse. In nature, spread of the virus is most likely via interrupted feeding of bloodsucking horseflies on a clinically ill horse and then on susceptible horses. Transmission can also occur by the iatrogenic transfer of blood through the use of contaminated needles. *In utero* infection of the fetus may occur (9). The virus titre is higher in horses with clinical signs and the risk of transmission is higher from these animals than the carrier animals with a lower virus titre.

B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Agar gel immunodiffusion (AGID) tests (7) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (17) are accurate, reliable tests for the detection of EIA in horses, except for animals in the early stages of infection and foals of infected dams. In other rare circumstances, misleading results may occur when the level of virus circulating in the blood during an acute episode of the disease is sufficient to bind available antibody, and if initial antibody levels never rise high enough to be detectable (18). Although the ELISA will detect antibodies somewhat earlier and at lower concentrations than the AGID test, positive ELISAs are confirmed using the AGID test. This is because false-positive results have been noted with ELISAs. The AGID test also has the advantage of distinguishing between EIA and non-EIA antigen-antibody reactions by lines of identity.

The EIAV is a lentivirus in the family Retroviridae, subfamily Orthoretrovirinae. Other members of the lentivirus genus include: bovine immunodeficiency virus; caprine arthritis encephalitis virus; feline immunodeficiency virus; human immunodeficiency virus 1; human immunodeficiency virus 2; and maedi/visna virus. Nucleic acid sequence comparisons have demonstrated a marked relatedness among these viruses.

1. Identification of the agent

a) Virus isolation and identification

Virus isolation is usually not necessary to make a diagnosis.

Isolation of the virus from suspect horses may be made by inoculating their blood on to leukocyte cultures prepared from horses free of infection. Virus production in cultures can be confirmed by detection of specific EIA antigen by ELISA (16), by immunofluorescence assay (20), by molecular tests or by subinoculation into susceptible horses. Virus isolation is rarely attempted because of the difficulty of growing horse leukocyte cultures.

When the exact status of infection of a horse cannot be ascertained, the inoculation of a susceptible horse with suspect blood should be employed. In this case a horse that has previously been tested for antibody and shown to be negative is given an immediate blood transfusion from the suspect horse, and its antibody status and clinical condition are monitored for at least 45 days. Usually, 1–25 ml of whole blood given intravenously is sufficient to demonstrate infection, but in rare cases it may be necessary to use a larger volume of blood (250 ml) or washed leukocytes from such a volume (5).

b) Polymerase chain reaction

A nested polymerase chain reaction (PCR) assay to detect EIA proviral DNA from the peripheral blood of horses has been described (13). The nested PCR method is based on primer sequences from the *gag* region of the proviral genome. It has proven to be a sensitive technique to detect field strains of EAV in white blood cells of EIA infected horses; the lower limit of detection is typically around 10 genomic copies of the target DNA (13, 14). A real-time reverse-transcriptase PCR assay has also been described (8). To confirm the results of these very sensitive assays, it is recommended that duplicate samples of each diagnostic specimen be processed. Because of the risk of cross contamination, it is also important that proper procedures are followed. Methods to insure the validity of PCR testing are discussed in detail in Chapter 1.1.5 Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases.

The following are some of the circumstances where the PCR assay maybe used for the detection of EIAV infection in horses:

- Conflicting results on serologic tests;
- Suspected infection but negative or questionable serologic results;
- Complementary test to serology for the confirmation of positive results;
- Confirmation of early infection, before serum antibodies to EIAV develop;
- Ensuring that horses that are to be used for antiserum or vaccine production or as blood donors are free of EIAV;
- Confirmation of the status of a foal from an infected mare.

2. Serological tests

Due to the persistence of EIAV in infected equids, detection of serum antibody to EIAV confirms the diagnosis of EIAV infection.

a) Agar gel immunodiffusion test (the prescribed test for international trade)

Precipitating antibody is rapidly produced as a result of EIA infection, and can be detected by the AGID test. Specific reactions are indicated by precipitin lines between the EIA antigen and the test serum and confirmed by their identity with the reaction between the antigen and the positive standard serum. Horses in the first 2–3 weeks after infection will usually give negative serological reactions. In rare cases the post-infection time prior to the appearance of detectable antibody may extend up to 60 days.

Reagents for AGID are available commercially from several companies. Alternately, AGID antigen and reference serum may be prepared as described below.

o Preparation of antigen

Specific EIA antigen may be prepared from the spleen of acutely infected horses (6), from infected equine tissue culture (11), from a persistently infected canine thymus cell line (3), or from proteins expressed in bacteria or baculovirus using the recombinant DNA technique (2, 10). Preparation from infected cultures or from recombinant DNA techniques gives a more uniform result than the use of spleen cells and allows for better standardisation of reagents.

To obtain a satisfactory antigen from spleen, a horse must be infected with a highly virulent strain of EIAV. The resulting incubation period should be 5–7 days, and the spleen should be collected 9 days after inoculation, when the virus titre is at its peak and before any detectable amount of precipitating antibody is produced. Undiluted spleen pulp is used in the immunodiffusion test as antigen (6). Extraction of antigen from the spleen with a saline solution and concentration with ammonium sulphate does not give as satisfactory an antigen as selection of a spleen with a very high titre of EIA antigen.

Alternatively, equine fetal kidney or dermal cells or canine thymus cells are infected with a strain of EIAV adapted to grow in tissue culture (American Type Culture Collection). Virus is collected from cultures by precipitation with 8% polyethylene glycol or by pelleting by ultracentrifugation. The diagnostic antigen, p26, is released from the virus by treatment with detergent or ether (11). EIAV core proteins, expressed in bacteria or baculovirus, are commercially available and find practical use as high quality antigens for serological diagnosis.

The p26 is an internal structural protein of the virus that is coded for by the *gag* gene. The p26 is more antigenically stable among EIAV strains than the virion glycoproteins gp45 and gp90 (12). There is evidence of strain variation in the p26 amino acid sequence; however there is no evidence to indicate that this variation influences any of the serological diagnostic tests (21).

o Preparation of standard antiserum

A known positive antiserum may be collected from a horse previously infected with EIAV. This serum should yield a single dense precipitation line that is specific for EIA, as demonstrated by a reaction of identity with a known standard serum. It is essential to balance the antigen and antibody concentrations in order to ensure the optimal sensitivity of the test. Reagent concentrations should be adjusted to form a narrow precipitation line approximately equidistant between the two wells containing antigen and serum.

o Test procedure (1, 6, 15)

- i) Immunodiffusion reactions are carried out in a layer of agar in Petri dishes. For Petri dishes that are 100 mm in diameter, 15–17 ml of 1% Noble agar in 0.145 M borate buffer (9 g H₃BO₃ plus 2 g NaOH per litre), pH 8.6 (± 0.2) is used. Six wells are punched out of the agar surrounding a centre well of the same diameter. The wells are 5.3 mm in diameter and 2.4 mm apart. Each well must contain the same volume of reagent.
- ii) The antigen is placed in the central well and the standard antiserum is placed in alternate exterior wells. Serum samples for testing are placed in the remaining three wells.
- iii) The dishes are maintained at room temperature in a humid environment.
- iv) After 24–48 hours the precipitation reactions are examined over a narrow beam of intense, oblique light and against a black background. The reference lines should be clearly visible at 24 hours, and at that time any test sera that are strongly positive may also have formed lines of identity with those between the standard reagents. A weakly positive reaction may take 48 hours to form and is indicated by a slight

bending of the standard serum precipitation line between the antigen well and the test serum well. Sera with high precipitating antibody titres may form broader precipitin bands that tend to be diffuse. Such reactions can be confirmed as specific for EIA by dilution at 1/2 or 1/4 prior to retesting; these then give a more distinct line of identity. Sera devoid of EIA antibody will not form precipitation lines and will have no effect on the reaction lines of the standard reagents.

- v) *Interpretation of the results:* Horses that are in the early stages of an infection may not give a positive serological reaction in an AGID test. Such animals should be bled again after 3–4 weeks. In order to make a diagnosis in a young foal, it may be necessary to determine the antibody status of the dam. If the mare passes EIA antibody to the foal through colostrum, then a period of 6 months or longer after birth must be allowed for the maternal antibody to wane. Sequential testing of the foal at monthly intervals may be useful to observe the decline in maternal antibody. To conclude that the foal is not infected, a negative result must be obtained (following an initial positive result) at least 2 months after separating the foal from contact with the EIA positive mare or any other positive horse. Alternatively PCR could be performed on the blood of the foal to determine the presence/absence of EIA provirus.

b) Enzyme-linked immunosorbent assay

There are four ELISAs that are approved by the United States Department of Agriculture for the diagnosis of equine infectious anaemia and are available internationally; a competitive ELISA and three non-competitive ELISAs. The competitive ELISA and two non-competitive ELISAs detect antibody produced against the p26 core protein antigen. The third non-competitive ELISA incorporates both p26 core protein and gp45 (viral transmembrane protein) antigens. Typical ELISA protocols are used in all tests. If commercial ELISA materials are not available, a non-competitive ELISA using p26 antigen purified from cell culture material may be employed (16).

A positive test result by ELISA should be retested using the AGID test to confirm the diagnosis because some false-positive results have been noted with the ELISA. The results can also be confirmed by the immunoblot technique. A standard antiserum for immunodiffusion, which contains the minimum amount of antibody that should be detected by laboratories, is available from the OIE Reference Laboratories (see Table given in Part 3 of this *Terrestrial Manual*). Uniform methods for EIA control have been published (19).

C. REQUIREMENTS FOR VACCINES AND DIAGNOSTIC BIOLOGICALS

No biological products are available currently.

REFERENCES

1. ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) (2000). Animal Health Analysis Methods. Detection of Antibodies against Equine Infectious Anaemia by the Agar Gel Immunodiffusion Test. NF U 47-002. AFNOR, 11 avenue Francis de Pressensé, 93571 Saint-Denis La Plaine Cedex, France.
2. ARCHAMBAULT D., WANG Z., LACAL J.C., GAZIT A., YANIV A., DAHLBERG J.E. & TRONICK S.R. (1989). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anaemia virus detection using recombinant Pr55gag. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1167–1173.
3. BOUILLANT A.M.P., NELSON K., RUCKERBAUER C.M., SAMAGH B.S. & HARE W.C.D. (1986). The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods*, 13, 309–321.
4. CHEEVERS W.M. & MCGUIRE T.C. (1985). Equine infectious anaemia virus; immunopathogenesis and persistence. *Rev. Infect. Dis.*, 7, 83–88.
5. COGGINS L. & KEMEN M.J. (1976). Inapparent carriers of equine infectious anaemia (EIA) virus. In: Proceedings of the IVth International Conference on Equine Infectious Diseases. University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA, 14–22.
6. COGGINS L., NORCROSS N.L. & KEMEN M.J. (1973). The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. *Equine Infect. Dis.*, III, 177–186.
7. COGGINS L., NORCROSS N.L. & NUSBAUM S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, 33, 11–18.

8. COOK R.F., COOK S.J., LI F.L., MONTELARO R.C., & ISSEL C.J. (2002). Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *Viral Methods*, **105**, 171–179.
9. KEMEN M.J. & COGGINS L. (1972). Equine infectious anaemia: transmission from infected mares to foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **161**, 496–499.
10. KONG X. K., PANG H., SUGIURA T., SENTSU H., ONODERA T., MATSUMOTO Y. & AKASHI H. (1997). Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. *Microbiol. Immunol.*, **41**, 975–980.
11. MALMQUIST W.A., BARNETT D. & BECVAR C.S. (1973). Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **42**, 361–370.
12. MONTELARO R.C., PAREKH B., ORREGO A. & ISSEL C.J. (1984). Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. *J. Biol. Chem.*, **16**, 10539–10544.
13. NAGARAJAN M.M. & SIMARD C. (2001). Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **94**, 97–109.
14. NAGARAJAN M.M. & SIMARD C. (2007). Gag genomic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada: implication on EIA diagnosis and peptide-based vaccine development. *Virus Res.*, **129**, 228–235.
15. PEARSON J.E. & COGGINS L. (1979). Protocol for the immunodiffusion (Coggins) test for equine infectious anaemia. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians*, **22**, 449–462.
16. SHANE B.S., ISSEL C.J. & MONTELARO R.C. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 351–355.
17. SUZUKI T., UEDA S. & SAMEJIMA T. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.*, **7**, 307–316.
18. TOMA B. (1980). Réponse sérologique négative persistante chez une jument infectée. *Rec. Med. Vet.*, **156**, 55–63.
19. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (2002). Equine Infectious Anemia Uniform Methods and Rules. <http://www.aphis.usda.gov/oa/pubs/eiaumr.pdf>
20. WEILAND F., MATHEKA H.D. & BOHM H.O. (1982). Equine infectious anaemia: detection of antibodies using an immunofluorescence test. *Res. Vet. Sci.*, **33**, 347–350.
21. ZHANG W., AUYONG D.B., OAKS J.L. & MCGUIRE T.C. (1999). Natural variation of equine infectious anemia virus Gag-protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Virology*, **261**, 242–252.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for Equine infectious anaemia (see Table in Part 3 of this *Terrestrial Manual* or consult the OIE Web site for the most up-to-date list: www.oie.int).

ANEXO 4 – Portaria 495/2010 do MAPA

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

PORTARIA Nº 495, DE 18 DE OUTUBRO DE 2010

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe conferem os arts. 10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, e tendo em vista o que consta do Processo nº 21000.006497/2010-20, resolve:

Art. 1º Alterar o item 6 do Anexo da Portaria nº 84, de 19 de outubro de 1992, que passa a vigorar com a seguinte redação:

"ANEXO NORMAS PARA CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

6. MÉTODOS:

6.1. O teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para o diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina (AIE), conforme descrito no Anexo I, é o teste indicado pela Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o diagnóstico desta enfermidade.

6.2. No caso de utilização de kits importados deverá ser seguida a instrução do protocolo constante da bula do distribuidor."(NR)

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

FRANCISCO SÉRGIO FERREIRA JARDIM

D.O.U., 19/10/2010 - Seção 1